

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4265699号
(P4265699)

(45) 発行日 平成21年5月20日 (2009. 5. 20)

(24) 登録日 平成21年2月27日 (2009. 2. 27)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
A 6 1 K 47/48 (2006. 01)	A 6 1 K 47/48
A 6 1 K 48/00 (2006. 01)	A 6 1 K 48/00
A 6 1 K 49/00 (2006. 01)	A 6 1 K 49/00 A
C O 7 K 14/00 (2006. 01)	C O 7 K 14/00

請求項の数 61 (全 63 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平10-539899	(73) 特許権者	502221282
(86) (22) 出願日	平成10年3月16日 (1998. 3. 16)		ライフ テクノロジーズ コーポレーショ ン
(65) 公表番号	特表2001-517939 (P2001-517939A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 920 08, カールスバッド, バン アレン ウェイ 5791
(43) 公表日	平成13年10月9日 (2001. 10. 9)	(74) 代理人	100102978
(86) 国際出願番号	PCT/US1998/005232		弁理士 清水 初志
(87) 国際公開番号	W01998/040502	(74) 代理人	100128048
(87) 国際公開日	平成10年9月17日 (1998. 9. 17)		弁理士 新見 浩一
審査請求日	平成14年3月4日 (2002. 3. 4)	(72) 発明者	ハウリーネルソン, パメラ
(31) 優先権主張番号	08/818, 200		アメリカ合衆国 メリーランド 2091 0, シルバー スプリング, ストニーブ ルック ドライブ 10112
(32) 優先日	平成9年3月14日 (1997. 3. 14)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ペプチドによって増強されるトランスフェクション

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞をトランスフェクトするための組成物であって、該組成物は、1つ以上の核酸分子、1つ以上のペプチド、および1つ以上のトランスフェクション薬剤を含み、該組成物において各ペプチドは、少なくとも2つの核局在化シグナル配列 (NLS) のコンカテマーを含み、かつ、核酸結合基に共有結合されており、そして、各ペプチドは、i) 単一の核酸結合基に共有結合されているか、またはii) 同一のアミノ酸配列を有するか、のいずれかまたは両方であり、該ペプチドがSp-NLSNLSである、組成物。

【請求項 2】

前記組成物が、2つ以上のトランスフェクション薬剤を含む、請求項1に記載の組成物。

10

【請求項 3】

前記トランスフェクション薬剤が、1つ以上のカチオン性脂質を含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項 4】

前記組成物が、ペプチド-核酸複合体の凝集体を含む、請求項3に記載の組成物。

【請求項 5】

前記トランスフェクション薬剤が、さらに1つ以上の中性脂質を含む、請求項3に記載の組成物。

【請求項 6】

前記1つ以上のカチオン性脂質が、1つ以上の1価カチオン性脂質を含む、請求項3に記載の

20

組成物。

【請求項 7】

前記1つ以上の1価カチオン性脂質が、DOTMA、DOTAP、DMRIE、およびDDABからなる群から選択される、請求項6に記載の組成物。

【請求項 8】

前記1つ以上のカチオン性脂質が、1つ以上の多価カチオン性脂質を含む、請求項3に記載の組成物。

【請求項 9】

前記1つ以上の多価カチオン性脂質が、DOSPA、DOSPER、DOGS、TMTPS、TMTOS、TMTLS、TMTMS、およびTMDOSからなる群から選択される、請求項8に記載の組成物。

10

【請求項 10】

前記1つ以上の中性脂質が、DOPE、DPhPE、およびコレステロールからなる群から選択される、請求項5に記載の組成物。

【請求項 11】

前記1つ以上の核酸分子が、1つ以上のDNA分子またはそのフラグメントである、請求項1に記載の組成物。

【請求項 12】

前記1つ以上の核酸分子が、1つ以上のRNA分子またはそのフラグメントである、請求項1に記載の組成物。

【請求項 13】

前記核局在化シグナル配列が、ウイルス性ペプチドである、請求項1に記載の組成物。

20

【請求項 14】

前記ウイルス性ペプチドが、インフルエンザウイルス、水疱性口内炎ウイルス、アデノウイルス、アルファウイルス、セムリキ森林ウイルス、肝炎ウイルス、ヘルペスウイルス、HIVウイルス、またはシミアンウイルスに由来する、請求項13に記載の組成物。

【請求項 15】

さらにDEAE-デキストラン、クロロキン、またはその組み合わせを含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項 16】

前記組成物が、初代細胞培養物、継代細胞培養物、または細胞株をトランスフェクトし得る、請求項1に記載の組成物。

30

【請求項 17】

前記細胞株が、ヒト細胞株である、請求項16に記載の組成物。

【請求項 18】

前記細胞株が、動物細胞株である、請求項16に記載の組成物。

【請求項 19】

前記細胞株が、線維芽細胞である、請求項16に記載の組成物。

【請求項 20】

前記各ペプチドについてのコンカテマーが、2つの同一な核局在化シグナル配列を含むコンカテマーである、請求項1に記載の組成物。

40

【請求項 21】

各ペプチドが、単一の核酸結合基に共有結合されている、請求項1に記載の組成物。

【請求項 22】

各ペプチドが、同一のアミノ酸配列を有する、請求項1に記載の組成物。

【請求項 23】

各ペプチドが、単一の核酸結合基に共有結合されており、かつ、同一のアミノ酸配列を有する、請求項1に記載の組成物。

【請求項 24】

細胞をトランスフェクトするための組成物であって、該組成物は、最初にペプチド-核酸複合体が形成された後、トランスフェクション薬剤を添加することによって生成され、該

50

ペプチド-核酸複合体は、核酸結合基をペプチドに結合体化させて、核酸結合基-ペプチド結合体を形成し、次いで、該核酸結合基-ペプチド結合体を核酸と混合することによって形成され、該ペプチドは、少なくとも2つの核局在化シグナル配列（NLS）のコンカテマーを含み、該核酸結合基-ペプチド結合体がSp-NLSNLSである、組成物。

【請求項 2 5】

前記ペプチド-核酸複合体が形成された後、該複合体が、カチオン性脂質と中性脂質との混合物に添加される、請求項24に記載の組成物。

【請求項 2 6】

前記ペプチドが、単一の核酸結合基に結合体化される、請求項24に記載の組成物。

【請求項 2 7】

前記核酸が、DNAである、請求項24に記載の組成物。

【請求項 2 8】

前記核酸が、RNAである、請求項24に記載の組成物。

【請求項 2 9】

前記トランスフェクション薬剤が、カチオン性脂質である、請求項24に記載の組成物。

【請求項 3 0】

前記カチオン性脂質が、前記ペプチド-核酸複合体と凝集する、請求項29に記載の組成物。

【請求項 3 1】

前記カチオン性脂質が、1価カチオン性脂質である、請求項29に記載の組成物。

【請求項 3 2】

前記1価カチオン性脂質が、DOTMA、DOTAP、DMRIE、およびDDABからなる群より選択される、請求項31に記載の組成物。

【請求項 3 3】

前記カチオン性脂質が、多価カチオン性脂質である、請求項29に記載の組成物。

【請求項 3 4】

前記多価カチオン性脂質が、DOSPA、DOSPER、DOGS、TMTPS、TMTOS、TMTLS、およびTMDOSからなる群より選択される、請求項33に記載の組成物。

【請求項 3 5】

1つ以上の中性脂質をさらに含む、請求項24に記載の組成物。

【請求項 3 6】

前記1つ以上の中性脂質が、DOPE、DPhPE、およびコレステロールから選択される、請求項35に記載の組成物。

【請求項 3 7】

核酸を用いて細胞をトランスフェクトする方法であって、請求項1に記載のトランスフェクション組成物をインビトロで該細胞と接触させる工程を包含する、方法。

【請求項 3 8】

核酸を用いてインビトロで細胞をトランスフェクトする方法であって、以下の工程：

(a) 核酸結合基を、少なくとも2つの核局在化シグナル配列（NLS）のコンカテマーを含むペプチドに共有結合させて、核酸結合基-ペプチド結合体を形成する工程；

(b) 1つ以上の核酸分子を核酸結合基-ペプチド結合体と混合し、ペプチド-核酸結合基-核酸複合体を形成する工程；

(c) 該ペプチド-核酸結合基-核酸複合体にトランスフェクション薬剤を添加し、該トランスフェクション薬剤および該ペプチド-核酸結合基-核酸複合体の混合物を得る工程；ならびに

(d) 該細胞を工程（c）由来の混合物と接触させる工程、を包含し、該核酸結合基-ペプチド結合体がSp-NLSNLSである、方法。

【請求項 3 9】

前記ペプチドが、単一の核酸結合基に共有結合されている、請求項38に記載の方法。

【請求項 4 0】

10

20

30

40

50

前記トランスフェクション薬剤が、カチオン性脂質である、請求項38に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記カチオン性脂質が、前記ペプチド-核酸複合体と凝集する、請求項40に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記カチオン性脂質が、1価カチオン性脂質である、請求項40に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記1価カチオン性脂質が、DOTMA、DOTAP、DMRIE、およびDDABからなる群より選択される、請求項42に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記カチオン性脂質が、多価カチオン性脂質である、請求項40に記載の方法。

10

【請求項 4 5】

前記多価カチオン性脂質が、DOSPA、DOSPER、DOGS、TMTPS、TMTOS、TMTLS、およびTMDOSからなる群より選択される、請求項44に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記細胞を接触させる工程の前に、工程 (b) の混合物に1つ以上の中性脂質を混合する工程をさらに包含する、請求項38に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記1つ以上の中性脂質が、DOPE、DPhPE、およびコレステロールから選択される、請求項46に記載の方法。

【請求項 4 8】

20

前記核酸が、DNAである、請求項38に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記核酸が、RNAである、請求項38に記載の方法。

【請求項 5 0】

トランスフェクション薬剤、および単離されたペプチドを含む、トランスフェクション薬剤キットであって、該単離されたペプチドは、少なくとも2つの核局在化シグナル配列 (NLS) のコンカテマーを含み、かつ、核酸結合基に共有結合されており、該ペプチドがSp-NLSNLSである、キット。

【請求項 5 1】

カチオン性脂質トランスフェクション薬剤を含む、請求項50に記載のキット。

30

【請求項 5 2】

前記ペプチドが、単一の核酸結合基に共有結合されている、請求項50に記載のキット。

【請求項 5 3】

前記コンカテマーが、SV40 ラージT抗原のNLSから選択される2つのNLSを含む、請求項50に記載のキット。

【請求項 5 4】

前記カチオン性脂質が、多価カチオン性脂質である、請求項51に記載のキット。

【請求項 5 5】

前記多価カチオン性脂質が、DOSPA、DOSPER、DOGS、TMTPS、TMTOS、TMTLS、およびTMDOSからなる群より選択される、請求項54に記載のキット。

40

【請求項 5 6】

前記カチオン性脂質が、1価カチオン性脂質である、請求項51に記載のキット。

【請求項 5 7】

前記1価カチオン性脂質が、DOTMA、DOTAP、DMRIE、およびDDABからなる群より選択される、請求項56に記載のキット。

【請求項 5 8】

1つ以上の中性脂質をさらに含む、請求項50に記載のキット。

【請求項 5 9】

前記1つ以上の中性脂質が、DOPE、DPhPE、およびコレステロールから選択される、請求項58に記載のキット。

50

【請求項60】

多価カチオン性脂質である2,3-ジオレイルオキシ-N-[2(スベルミンカルボキサミド)エチル]-N,N-ジメチル-1-プロパンイミニウムトリフルオロアセテートおよびジオレイルホスファチジルエタノールアミンの3:1(w/w)混合物を含む、請求項50に記載のキット。

【請求項61】

単一の核酸結合基に共有結合された少なくとも2つの核局在化シグナル配列(NLS)のコンカテマーを含むペプチドであって、該核酸結合基は、ポリアミンであり、該ペプチドがSp-NLSNLSである、ペプチド。

【発明の詳細な説明】

発明の分野

真核生物細胞をトランスフェクトするために有用な、必要に応じて核酸結合基、脂質もしくはデンドリマー(dendrimer)に結合させたペプチド、ならびにカチオン性脂質およびデンドリマーポリマーを含むトランスフェクション薬剤を含む組成物が開示される。このような組成物を用いて真核生物細胞をトランスフェクトする方法もまた、開示される。

発明の背景

リポソームのような脂質凝集体は、生細胞にDNA、RNA、およびタンパク質のような巨大分子の導入を容易にするように機能し得る。カチオン性脂質成分を含む脂質凝集体は、特定のタイプの細胞に核酸のような大きなアニオン性分子の送達および導入に効果的であり得る。Felgner, P.L. および Ringold, G.M. (1989) Nature 337:387-388 および Felgner, P.L. ら (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413 を参照。大部分の細胞膜は正味の負電荷を有するので、アニオン性分子、特に高分子量のアニオン性分子は細胞には容易には取り込まれない。カチオン性脂質は、負電荷を中和する傾向のある核酸のようなポリアニオンと凝集体化し、そして結合する。細胞への核酸のトランスフェクションにおけるカチオン性脂質の効果は、カチオン性脂質-核酸凝集体の細胞に対するアフィニティーの増強、および膜融合における親油性成分の機能由来の結果と考えられる。

デンドリマーは、開始体(initiator)コア、コアに放射状に付着する反復単位の内部層(またはジェネレーション(generation))、および末端官能基の外部表面から構成される放射形対称を有する、規則的な樹状分枝を有する新しいタイプの合成ポリマーである。D.A. Tomalia および H.D. Durst (1993) E. Weber (編) Topics in Current Chemistry, 第165巻: Supramolecular Chemistry I-Directed Synthesis and Molecular Recognition, Springer-Verlag, Berlin, 193-313 頁を参照。デンドリマーのサイズ、形、および表面電荷密度は、コアの選択、反復単位、ジェネレーションの数、および末端官能基によって制御されている。米国特許第5,527,524号、同第5,338,532号、同第4,694,064号、同第4,568,737号、同第4,507,466号、ならびにPCT特許出願; W08801179; W08801178; W09524221; および W09502397 を参照。「STARBURST」(Dendritech, Inc., 登録商標) または デンススターポリアミドアミンデンドリマー(dense star polyamidoamine dendrimer) は、哺乳動物細胞へのDNAの効率的なトランスフェクションを媒介すると報告されてきた(J.F. Kukowska-Lattalla ら (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:4897-4902 および A. Bielinska ら (1996) Nucleic Acids Res. 24 (11):2176-2182)。「SUPERFECT」(Qiagen, Inc., 登録商標) または 活性化デンドリマーは、哺乳動物細胞への、DNAの効率的なトランスフェクションを媒介することが報告されてきた(J. Haensler および R. Szoka (1993) Bioconjugate Chem. 4:372-379 および M.X. Tang ら (1996) Bioconjugate Chem. 7:703-714)。PCT特許出願 W09524221 は、生物活性または標的化デンドリマー結合体に関する。PCT特許出願 W09319768 および W09502397 は、デンドリマーを含むポリヌクレオチド送達系に関する。

カチオン性脂質およびデンドリマーを含むトランスフェクション薬剤は、普遍的にすべての細胞タイプのトランスフェクションに効果的であるわけではない。異なる細胞のトランスフェクションの効果は、特定のトランスフェクション薬剤組成物および形成された脂質凝集体またはデンドリマー複合体のタイプに依存する。一般的に、多価カチオン性脂質は、真核生物細胞のトランスフェクトにおいて一価カチオン性より効率的である。Behr, J-P. ら (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. 86:6982-6986、Hawley-Nelson, P. ら (1993) FOCUS 15:7

10

20

30

40

50

3および米国特許第5,334,761号 (Gebeyehuら)。例えば、Behrら、およびEPO公開出願304 111 (1990) は、5-カルボキシスペルミルグリシンジオクタデシル-アミド (DOGS) およびジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン5-カルボキシスペルミルアミド (PPES) を含む、カルボキシスペルミン含有カチオン性脂質を使用して改善されたトランスフェクションを記載している。多価カチオン性リポソームトランスフェクション試薬1,3ジオレオイルオキシ-2- (6-カルボキシスペルミル) -プロピル-アミド (DOSPER、Boeringer-Mannheim) および「MULTIFECTOR」 (VennNova, Inc.、登録商標) は、他の例である。トランスフェクションのために、DNA/デンドリマーの最適荷電比は、1 : 5 ~ 1 : 50の間であることが見い出され、そしてG5 (ジェネレーション5) ~ G10 (ジェネレーション10) デンドリマーが、トランスフェクションを媒介し得ると報告された。所定のデンドリマーのトランスフェクション効率、カチオン性脂質媒介のトランスフェクションで観察されたように、細胞タイプによって変化した (J.F.Kukowska-Latollaら (1996) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93:4897-4902)。

多くの生物学的物質が細胞によって、レセプター媒介のエンドサイトーシスを介して取り込まれる。PastanおよびWillingham (1981) Science 214:504-509を参照。この機構は、リガンドの細胞表面レセプターへの結合、リガンド結合レセプターのクラスター化、および被覆ピットの形成、続くリガンドのエンドソームへのインターナリゼーションを含む。インフルエンザウイルスおよびアルファウイルスのような、エンベロープを有する (enveloped) ウイルス、およびアデノウイルスのような、エンベロープを有さないウイルスの両方が、エンドサイトーシスの機構を介して細胞に感染する。Pastan, I.ら (1986) Virus Attachment and Entry into Cells、(Crowell, R.L.およびLonberg-Holm, K.編) Am.Soc. Microbiology, Washington, 141-146頁; Kielian, M.およびHelenius, A. (1986) 「Entry of Alphaviruses」 The Togaviridae and Flaviviridae、(Schlesinger, S.およびSchlesinger, M.J.編) Plenum Press, New York 91-119頁; FitzGerald, D.J.P.ら (1983) Cell 32:607-617。クロロキン (向リソソーム剤 (lysosomotropic agent)) によるいくつかの細胞のデンドリマー媒介トランスフェクションの増強は、エンドサイトーシスが少なくともいくつかのデンドリマー媒介トランスフェクションに関与することを示唆する。

しかし、それらの相対的な効果にも関わらず、多価カチオン性脂質試薬を用いた真核細胞培養物の成功裡なトランスフェクションは、しばしば多くの核酸の用量を必要とする (細胞当たり約 10^5 DNA分子)。ウイルス感染により媒介される外来DNA配列の真核生物細胞への導入は、一般的に、カチオン性脂質またはデンドリマートランスフェクション薬剤を用いるトランスフェクションより効率的な数量のオーダーである。培養におけるすべての細胞のウイルス感染は、細胞当たり10ウイルス粒子より少ない量を要求する。融合の詳細なメカニズムは十分に理解されておらず、そしてウイルスの間で変化するが、ウイルス融合は、代表的にはウイルスタンパク質、ウイルススパイク糖タンパク質およびウイルススパイク糖タンパク質のペプチドのような特定の融合誘導 (fusagenic) 因子を含む。例えば、水疱性口内炎ウイルス (VSV) 融合は、VSV糖タンパク質 (Gタンパク質) と膜脂質との間の相互作用を含むと考えられている (Schlegel, R.ら (1983) Cell 32:639-646)。VSV Gタンパク質は、報告されるように酸性リン脂質ホスファチジルセリンのような飽和可能なレセプターに優先的に結合する (Schlegel, R.およびM.Wade, (1985) J.Virol.53 (1) : 319-323)。インフルエンザウイルスの融合は、赤血球凝集素HA-2 N-末端融合誘導ペプチドを含む。Kamata, H.ら (1994) Nucl.Acids.Res.22 (3) :536-537を参照。

細胞結合およびインターナリゼーションはまた、細胞レセプターに結合するペプチドを用いて、増強されるか、加速されるか、または選択的に作られ得る。例えば、アデノウイルスコートのペントンベースタンパク質はペプチドモチーフRGD (Arg-Gly-Asp) を含み、これはウイルスのインテグリンへの結合、およびレセプター媒介のエンドサイトーシスを介したウイルスインターナリゼーションを媒介する (Wickham, T.J.ら (1995) Gene Therapy 2:750-756)。

最近、カチオン性脂質トランスフェクションの効率は、トランスフェクション混合物に全ウイルス粒子を添加することによって増強されることが示されてきた。Yoshimuraら (199

10

20

30

40

50

3) J.Biol.Chem.268:2300を参照。特定のウイルス成分もまた、カチオン性脂質媒介のトランスフェクションの効率を増強し得る。1993年7月12日に出願された、米国特許出願番号第08/090,290号；および1994年7月12日に出願された、同第08/274,397号、現在米国特許第5,578,475号；（これらはその全体が本明細書で参考として援用される）を参照。脂質媒介のトランスフェクションを増強するウイルスタンパク質由来のペプチドの使用はまた、最近Kamataら（1994）Nucl.Acids Res.22:536によって示唆された。Kamataらは、「LIPOFECTIN」-媒介のトランスフェクションが、トランスフェクション混合物へのインフルエンザウイルス赤血球凝集素ペプチドの添加によって3～4倍増強され得ることを示唆する。これらのポジティブな初期の指摘にも関わらず、脂質性トランスフェクション組成物における融合誘導、または核局在化ペプチドを含む効果に関して結果は変動する。Remyら（1995）Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92:1744は、「融合誘導または核局在化ペプチドヘッド基を含む脂質の（多価カチオン性脂質-DNA複合体）粒子への添加は、すでに効率的な系を有意には改善しない」ことを報告する。

発明の要旨

本発明は、ウイルス、細菌、または動物タンパク質および他の供給源由来のペプチド配列（ペプチド、タンパク質、もしくはフラグメントまたはその一部を含む）が、カチオン性脂質およびデンドリマーを含むトランスフェクション薬剤によって媒介される真核細胞のトランスフェクションの効率を顕著に増強し得るという発見に基づく。本発明の組成物および方法は、ペプチド、タンパク質、およびそのフラグメントを含み、改変ペプチド、改変タンパク質、およびその改変フラグメント、ペプチド結合体、タンパク質結合体、およびそのフラグメントの結合体を含み、融合誘導、膜透過性、レセプター-リガンドおよび／または核局在化ペプチドもしくはタンパク質、あるいは他の細胞下位置に局在するペプチドまたはタンパク質（例えば、ミトコンドリア局在化ペプチドまたはタンパク質）を含み、これらは核酸に結合した場合、トランスフェクションの効率を顕著に改善する。好ましい実施態様において、ペプチド、タンパク質、そのフラグメント、または改変ペプチド、タンパク質、およびそのフラグメントは、トランスフェクション試薬を添加する前に核酸に結合させるか、または添加するが、このようなペプチド、タンパク質、フラグメントおよびその改変体は、核酸の添加の前にトランスフェクション試薬に添加するか、または複合体化させ得る。あるいは、核酸は、ペプチド、タンパク質、フラグメントおよびその改変体の添加の前にトランスフェクション試薬と組み合わせる。これらの融合誘導、レセプター-リガンド、核局在化、輸送（transport）またはトラフィックキング（trafficking）、または他のペプチドは、細胞に導入される核酸と非共有結合または複合体を形成し得る。複合体形成は、ペプチドまたはタンパク質の、DNA結合基への共有結合によって増強され得、このDNA結合基は、コンフォメーションまたは電荷の相互作用を通じて核酸に結合し得、そしてペプチドのDNAへの結合を容易にする。より一般的には、核酸-ペプチドまたはタンパク質複合体形成は、ペプチドまたはタンパク質の核酸結合基への共有結合によって増強され得る。核酸（DNAおよびRNAおよびその改変体）は、本発明のペプチドまたはタンパク質に結合された場合、トランスフェクション薬剤によってより効率的に細胞に輸送され、そして適切なペプチドまたはタンパク質の選択により細胞核、または他の細胞下位置に指向され得、従ってより少ない核酸の出発物質が必要とされる。

本発明はまた、トランスフェクション薬剤へのペプチドまたはタンパク質の共有結合に関する（例えば、直接的に、または適切な連結もしくはスペーサー基を介する、カチオン性脂質トランスフェクション組成物の脂質（カチオン性または中性脂質）への結合、あるいは、直接的に、または適切な連結もしくはスペーサー基を介する、デンドリマーへの結合）。特に興味深いものは、融合誘導ペプチドまたはタンパク質、輸送またはトラフィックキングペプチドまたはタンパク質、膜透過性ペプチドまたはタンパク質、ならびに、レセプター-リガンドペプチドまたはタンパク質に共有結合する、結合体化した脂質およびデンドリマーである。種々のスペーサー基が、トランスフェクション薬剤およびペプチドもしくはタンパク質に依存して使用され得る。例えば、スペーサーは、アルキル、エーテル、チオエーテル、エステル、またはアミド基であり得る。

本発明のカチオン性脂質組成物および本発明のデンドリマー組成物は、先行技術の組成物を越えて、増強されたトランスフェクション頻度を含む、顕著な利点を提供する。

本発明は、真核生物細胞、特に、高等真核生物細胞を、核酸を用いてトランスフェクトするための組成物および方法を提供する。核酸（DNAおよびRNAの両方）は、細胞に導入され、その結果、その核酸はそれらの生物学的機能を維持する。ペプチド-核酸複合体またはタンパク質-核酸複合体およびトランスフェクション薬剤を含む真核生物細胞をトランスフェクトするための組成物が提供される。本発明のトランスフェクション組成物は、トランスフェクション薬剤が、任意の脂質、好ましくはカチオン性脂質、カチオン性脂質の混合物、またはカチオン性脂質および中性脂質との混合物であるものを含む。本発明のトランスフェクション組成物はまた、トランスフェクション薬剤が、デンドリマーまたはデンドリマーの混合物、ならびにデンドリマーおよび中性脂質またはカチオン性脂質の混合物であるものを含む。トランスフェクション組成物は、ペプチドまたは改変ペプチド、例えば、ペプチド結合体、あるいは改変されたか、または結合体化されたタンパク質もしくはフラグメントまたはその部分を含む。これは、核酸に結合し得、そして融合誘導であるか、膜透過性であり、あるいは核局在化させるために機能するか、輸送もしくはトラフィッキングするために機能するか、別の細胞成分位置へ局在化させるために機能するか、および/もしくはレセプター-リガンドとして機能する。本発明のレセプター-リガンドペプチドまたはタンパク質は、細胞表面レセプター、膜レセプター、または細胞質ゾルレセプターに結合するものを含み、そしてこれは、細胞標的化または細胞接着のために機能し得、そして内部移行またはエンドサイトーシスを誘発するものを含み得る。ペプチド-核酸複合体またはタンパク質-核酸複合体は、ペプチドもしくはタンパク質または改変ペプチドもしくは改変タンパク質と、核酸とが相互作用することによって、あるいは、ペプチドまたはタンパク質と、核酸-トランスフェクション薬剤複合体との相互作用によって形成される。改変ペプチドまたは改変タンパク質は、核酸結合基に共有結合したペプチドまたはタンパク質を含む。本発明のペプチド-結合体またはタンパク質-結合体はまた、ペプチド-脂質もしくはタンパク質-脂質（中性またはカチオン性）、およびペプチド-デンドリマー複合体もしくはタンパク質-デンドリマー複合体を含み、ここで、このペプチドまたはタンパク質は、トランスフェクション薬剤またはトランスフェクション薬剤の成分に共有結合される。

非共有結合ペプチド増強-脂質トランスフェクションまたはタンパク質-増強脂質トランスフェクション、ペプチド-核酸複合体またはタンパク質-核酸複合体は、続いて、脂質、好ましくは、カチオン性脂質（またはカチオン性脂質および中性脂質の混合物）と合わされて、細胞膜（核膜を含む）を介してアニオン性核酸の導入を容易にするか、または特定の細胞もしくは特定の細胞成分の位置へと核酸を標的化するペプチド-核酸-脂質凝集体またはタンパク質-核酸-脂質凝集体を形成する。ペプチド-核酸複合体またはタンパク質-核酸複合体および脂質を含む、本発明のトランスフェクション組成物は、トランスフェクションをさらに増強することが公知である他の非ペプチド薬剤をさらに含み得る。共有結合ペプチド-脂質結合体またはタンパク質-脂質結合体を使用する脂質トランスフェクションについては、ペプチド-脂質結合体またはタンパク質-脂質結合体は、カチオン性脂質トランスフェクションについて従来と同様に、核酸と合わされる。ペプチド-脂質結合体またはタンパク質-脂質結合体は、まず結合体化されていないカチオン性脂質および/または中性脂質の混合物と合わされ得、次いで、核酸と合わされて、細胞膜（核膜を含む）を介してカチオン性核酸の導入を容易にするか、または核酸を特定の細胞もしくは特定の細胞成分の位置へと標的化する、ペプチド-脂質-核酸またはタンパク質-脂質-核酸の脂質凝集体を形成する。ペプチド-脂質結合体またはタンパク質-脂質結合体および核酸を含む、本発明のトランスフェクション組成物は、トランスフェクションをさらに増強することが公知である、他の非ペプチド薬剤または非タンパク質薬剤をさらに含み得る。

脂質に共有結合した融合誘導ペプチドまたはタンパク質を用いる本発明の別のトランスフェクション法において、ペプチド-脂質結合体またはタンパク質-脂質結合体は、結合体

10

20

30

40

50

化されていないカチオン性脂質（またはカチオン性脂質および中性脂質の混合物）と複合体化される。細胞内局在（sub-cellular）ペプチドまたはタンパク質、好ましくは、核局在ペプチドまたはタンパク質は、核酸と複合体化されて、そして核酸-ペプチドまたは核酸-タンパク質複合体は、共有結合された融合誘導ペプチドまたはタンパク質を含むカチオン性脂質含有複合体と混合される。得られる混合物は、増強されたトランスフェクション効率を示す。

デンドリマートランスフェクションについては、共有結合ペプチド-デンドリマー複合体またはタンパク質-デンドリマー複合体は、続いて核酸と合わされて、デンドリマー媒介トランスフェクションについて当該分野で公知であるように、細胞膜（核膜を含む）を介してカチオン性核酸の導入を容易にするかまたは核酸を特定の細胞もしくは特定の細胞成分の位置へと標的化する、ペプチド-デンドリマー-核酸またはタンパク質-デンドリマー-核酸の脂質凝集体を形成する。ペプチド-デンドリマー結合体またはタンパク質-デンドリマー結合体が利用される場合、このペプチドまたはタンパク質は、大部分については、形成されたデンドリマー凝集体の外表面に濃縮されていると考えられる。ペプチド-デンドリマー結合体またはタンパク質-デンドリマー結合体および核酸を含む、本発明のトランスフェクション組成物は、デンドリマートランスフェクションをさらに増強し得ることが公知であるその他の非ペプチド薬剤をさらに含み得、例えば、デンドリマートランスフェクションは、DEAE-デキストランおよび/またはクロロキンの添加によって増強され得る。

デンドリマーに結合した融合誘導ペプチドまたはタンパク質を使用する、本発明の別のトランスフェクション組成物においては、ペプチド-デンドリマー結合体またはタンパク質-デンドリマー結合体は、細胞内局在ペプチドまたはタンパク質、好ましくは核局在ペプチドまたはそれ自体がタンパク質に複合体化される核酸と混合される。新たな複合体（例えば、VSVGまたはRGDまたはE5-デンドリマーに複合体化されたSp-NLS-核酸）は、必要に応じて、結合体化していないデンドリマーと混合されるかまたは必要に応じて、カチオン性脂質含有組成物と混合される。得られる混合物は、増強されたトランスフェクション効率を示す。

トランスフェクション組成物において有用なペプチドは、融合誘導であるか、核もしくは他の細胞内局在化のために機能するか、輸送もしくはトラフィックキングするために機能するか、レセプターリガンドであるか、細胞接着シグナル、細胞標的化シグナル、細胞内部移行シグナル、もしくはエンドサイトーシスシグナルを含むか、ならびにウイルス融合誘導タンパク質の、ウイルス核局在シグナルの、レセプターリガンドの、細胞接着シグナルの、細胞標的化シグナルの、もしくは細胞内部移行シグナルの、またはエンドサイトーシス-誘発シグナルのペプチドもしくはその機能性部分を含むタンパク質および/またはポリペプチドの機能性部分を含むが、それらに限定されない。本発明に有用なペプチドは、天然に存在するペプチド、合成または操作されたタンパク質もしくはペプチドに由来するペプチド、および合成アナログまたは天然に存在するペプチドの機能性等価物を含む。本発明のペプチドは、20の一般的に存在するアミノ酸、ならびにホモシステインおよびオルニチン、またはDアミノ酸もしくはアミノ酸アナログのような稀なアミノ酸から構成されるものを含む。本発明のペプチドおよびタンパク質は、カルボキシスベルミンのようなポリアミンを含み得る。インフルエンザウイルス、水疱性口内炎ウイルス、アデノウイルス、およびシミアンウイルス40のウイルスペプチドまたはその機能性部分を含むトランスフェクション組成物は、特に興味深い。DNA結合基、例えば、スベルミンまたは関連ポリアミンに共有結合されるように改変されたウイルスペプチド（ならびにタンパク質およびポリペプチド）を含むトランスフェクション組成物もまた、本発明の方法に有用である。任意のタンパク質（またはフラグメントもしくはその部分）は、本発明に従って1つかまたは他のタンパク質もしくはペプチドと組み合わせてのいずれかで用いられ得る。好ましい局面においては、2つ以上、3つ以上、4つ以上、5つ以上、6つ以上などのタンパク質および/またはペプチドが本発明に使用される。さらに、このような1つまたは複数のタンパク質および/またはペプチドは、1つ以上、2つ以上、3つ以上、4つ以上、5つ

10

20

30

40

50

以上、6つ以上などのトランスフェクション薬剤と組み合わせて用いられ得る。別の好ましい局面においては、少なくとも2つのペプチドおよび/またはタンパク質が、トランスフェクション薬剤、好ましくは、脂質および/もしくはデンドリマーのような少なくとも2つのトランスフェクション薬剤と組み合わせて用いられる。

トランスフェクション組成物に有用なタンパク質は、クロマチン、細菌内部移行媒介タンパク質、細菌性毒素、または毒素部分（不活化された毒素部分を有する）に由来するタンパク質を含むレセプターリガンド、膜結合および融合タンパク質、輸送またはトラフィッキングタンパク質、核局在化タンパク質、核タンパク質を含むが、それらに限定されない。これらのタンパク質は、細胞に侵入し、そして細胞成分区画、膜障害タンパク質、および抗菌性タンパク質に局在する。タンパク質は、ウイルス、細菌、動物および他の供給源に由来するものを含む。有用なレセプターリガンドタンパク質には、インスリン、トランスフェリン、上皮細胞増殖因子、線維芽細胞増殖因子、ラクトフェリン、およびフィブロネクチンが挙げられるが、それらに限定されない。有用なウイルス膜結合および融合タンパク質には、アデノウイルスタンパク質ペントン塩基、ノブ (knob)、およびヘキソン、水疱性口内炎ウイルス糖タンパク質 (VSVG)、セムリキ森林ウイルス由来のコートタンパク質およびインフルエンザ血球凝集素 (HA) が挙げられるが、それらに限定されない。ウイルス輸送またはトラフィッキングタンパク質には、HIV Tat、B型肝炎ウイルスコアタンパク質、および単純ヘルペスウイルスVP22が挙げられるが、それらに限定されない。有用な核およびクロマチンのタンパク質の一覧には、ヒストンタンパク質、特にH1およびH2、「HMG」タンパク質、特にHMG1およびHMG17、プロタミンならびにhn RNP A1が挙げられるが、それらに限定されない。細菌内部移行タンパク質には、インベーシン (invasin) およびインターナリン (internalin)、ならびにListeriaおよびMyobacterium tuberculosis由来の類似の機能を有するタンパク質が挙げられるが、それらに限定されない。細胞に侵入し、細胞成分区画に局在する細菌毒素には、シュードモナス内毒素A、ジフテリア毒素、およびシゲラ毒素が挙げられるが、それらに限定されない。各々の場合において、これらのタンパク質およびポリペプチドの細菌性毒素機能は、トランスフェクトされた細胞に対する損害を回避するため不活化される。膜障害および抗菌性タンパク質（あるものは毒液に由来する）は、メリチン、マゲイニン (magainin)、グラミシジン、セクロピン (cecropin)、ディフェンシン、プロテグリン (protegrin)、タキプレシン (tachyplesins)、チオニン (thionin)、インドリシジン (indolicidin)、バクテネシン (bactenecin)、ドロソマイシン (drosomycin)、アピデシン (apidaecin)、カテリシジン (cathelicidin)、殺細菌/透過性増加タンパク質 (BPI)、ナイシン (nisin)、およびブフォリン (buforin) が挙げられるが、それらに限定されない。

カチオン性脂質トランスフェクション組成物中へのペプチド-核酸複合体もしくはタンパク質-核酸複合体または改変ペプチド-核酸複合体もしくは改変タンパク質-核酸複合体の包含は、カチオン性脂質単独により媒介された核酸のトランスフェクションに比較して、核酸のトランスフェクションを有意に増強し得る（2倍以上）。ペプチドもしくはタンパク質もしくは改変ペプチドもしくは改変タンパク質またはそれらのフラグメントによるデンドリマートランスフェクションの増強は、広範な種々の細胞株（ヒト初代細胞株を含む）および当業者によって一般的に「トランスフェクトしにくい」と考えられている細胞株で明白である。

一価または多価カチオン性脂質は、カチオン性脂質トランスフェクション組成物に使用される。好ましい一価カチオン性脂質は、DOTMA (N-[1-(2,3-ジオレオイルオキシ)-プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド)、DOTAP (1,2-ビス(オレオイルオキシ)-3,3'-(トリメチルアンモニウム)プロパン)、DMRIE (1,2-ジミリスチルオキシプロピル-3-ジメチル-ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド) またはDDAB (ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド) である。好ましい多価カチオン性脂質は、リポスベルミン、特にDOSPA (2,3-ジオレイルオキシ-N-[2(スベルミンカルボキサミド)エチル]-N,N-ジメチル-1-プロパンアミニウム (propanaminium) トリフルオロ酢酸) およびDOSPER (1,3-ジオレオイルオキシ-2-(6カルボキシスベルミル)-プロピルアミド)、およびジお

10

20

30

40

50

よびテトラ-アルキル-テトラ-メチルスぺルミンであり、TMTPS（テトラメチルテトラパルミトイルスぺルミン）、TMTOS（テトラメチルテトラオレイルスぺルミン）、TMTLS（テトラメチルテトララウリルスぺルミン）、TMTMS（テトラメチルテトラミリスチルスぺルミン）およびTMDOS（テトラメチルジオレイルスぺルミン）が挙げられるがそれらに限定されない。カチオン性脂質は、必要に応じて非カチオン性脂質、特に、中性脂質（例えば、DOPE（ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン）、DPhPE（ジフィタノイルホスファチジルエタノールアミン）またはコレステロール）のような脂質と組み合わせられる。DO SPAおよびDOPEの3:1（w/w）混合物またはDOTMEおよびDOPEの1:1（w/w）混合物から構成されるカチオン性脂質組成物は、一般的に本発明のトランスフェクション組成物に有用である。好ましいトランスフェクション組成物は、高等真核生物細胞株の実質的なトランスフェクションを誘導するものである。

10

デンドリマートランスフェクション組成物中へのペプチド-核酸もしくはタンパク質-核酸または改変ペプチド-核酸複合体もしくは改変タンパク質-核酸複合体の包含は、デンドリマー単独またはDEAEデキストランもしくはクロロキニンもしくは両方の組合せにより媒介された核酸のトランスフェクションと比較して、核酸のトランスフェクションを有意に増強し得る（2倍以上）。ペプチド、タンパク質、改変ペプチド、または改変タンパク質によるトランスフェクションの増強は、広範な種々の細胞株（ヒト初代細胞株を含むおよび当業者によって一般的に「トランスフェクトしにくい」と考えられている細胞株）で明白である。

一般的に、任意の細胞、特に真核生物細胞に核酸を導入するために用いられ得る任意のデンドリマーは、本発明の改善されたトランスフェクション組成物および方法に有用である。第5ジェネレーション以上（G5以上）のデンドリマーが好ましく、G5～G10の間のジェネレーションのものは、特に興味深い。本発明のデンドリマーは、 NH_3 またはエチレンジアミンコア、GX（ NH_3 ）またはGX（EDA）を有するものを含み、ここでXは、ジェネレーション番号である。X = 5～10のデンドリマーが好ましい。本発明のデンドリマーは、内部層の反復ユニットがアミドアミンである（ポリアミドアミン、すなわち、PAMAMを形成する）ものを含む。本発明のデンドリマーは、デンドリマーの外表面で末端官能基が正電荷密度を提供するもの（例えば、末端アミン官能基を伴うようなもの）を含む。外側デンドリマー表面の表面電荷および化学的性質は、表面の官能基を変化させることによって（例えば、表面アミン基のいくつかまたは全ての反応によって）変化し得る。特に目的のデンドリマーは、リジンまたはアルギニンのようなカチオン性アミノ酸との反応によって官能化されたものである。例えば、PCT出願W0 9622321およびW0 9631549ならびに米国特許第5,266,106号に記載のような、グラフト化デンドリマーは、本発明の組成物および方法に利用され得る。活性化デンドリマー（J.HaenslerおよびR.Szoka（1993）Bioconjugate Chem. 4:372-379ならびにM.X.Tangら（1996）Bioconjugate Chem. 7P703-714）もまた、本発明の組成物および方法に使用され得る。

20

30

本発明の方法は、任意の細胞、好ましくは、真核生物細胞を、ペプチド、タンパク質またはフラグメントもしくはその部分（融合誘導、膜透過性、輸送またはトラフィック細胞内局在化を含む）、あるいはレセプター-リガンド、ペプチドもしくはタンパク質（必要に応じて、核酸結合基に結合体化されたかもしくは必要に応じてトランスフェクション薬剤（脂質またはデンドリマー）に結合されたものを含む）トランスフェクション組成物と接触させる工程を包含する。ここで、このペプチドもしくはタンパク質または改変ペプチドもしくはタンパク質は、核酸と非共有結合される。1つの実施態様において、ペプチド-核酸複合体またはタンパク質-核酸複合体（ここで、このペプチドまたはタンパク質は、核酸結合基に結合体化され得る）が形成され、次いで、カチオン性脂質とトランスフェクションのために合わされる。関連する実施態様において、ペプチド-脂質結合体またはタンパク質-脂質結合体は、必要に応じて、任意の適切なカチオン性脂質を含む他の脂質と合わされ、次いで、トランスフェクションのために核酸と合わされる。別の関連する実施態様において、核酸-脂質複合体が形成されて、次いで、トランスフェクションのためにペプチドまたはタンパク質と合わされる。第2の実施態様において、ペプチド-核酸

40

50

複合体またはタンパク質-核酸複合体（ここで、ペプチドまたはタンパク質は、核酸結合基に結合体化され得る）が形成され、次いで、トランスフェクションのためにデンドリマーと合わされる。関連する実施態様において、ペプチド-デンドリマー複合体は、必要に応じて、他のデンドリマーと合わされ、次いでトランスフェクションのために核酸と組み合わせられる。別の関連する実施態様において、核酸-デンドリマー複合体が形成されて、次いで、トランスフェクションのためにペプチドまたはタンパク質と合わされる。デンドリマーおよび/またはペプチド結合体化デンドリマーは、カチオン性脂質およびカチオン性脂質組成物と合わされ、改善された核酸トランスフェクション組成物が得られ得る。本発明によれば、複数のペプチドおよび/またはタンパク質がトランスフェクションを達成するために添加され得る。

10

本発明の方法は、とりわけ、インフルエンザウイルス、アデノウイルス、セムリキ森林ウイルス、HIV、肝炎ウイルス、単純ヘルペスウイルス、水疱性口内炎ウイルスまたはシミアンウイルス40のウイルスペプチドまたはタンパク質、そしてさらに詳細には、RGDペプチド配列、NLSペプチド配列、および/またはVSVGペプチド配列を使用して、そして前述の各々のペプチドまたはタンパク質を改変する。本発明の方法は、接着細胞株または浮遊細胞株、一般的には、動物細胞株、詳細には哺乳動物、鳥類、爬虫類、両生類、および昆虫細胞株、そしてより詳細には、動物初代細胞株、ヒト初代細胞株、幹細胞株、および線維芽細胞、ならびに生きている生物においてインビボでの細胞に対するトランスフェクションに適用可能である。

1つの特定の実施態様において、トランスフェクション増強ペプチドまたはタンパク質は、まず核酸に結合されて細胞に導入される。次いで、ペプチド-核酸複合体またはタンパク質-核酸複合体は、トランスフェクション薬剤（またはその混合物）と混合される。そして得られた混合物を使用して、細胞をトランスフェクトする。好ましいトランスフェクション薬剤は、カチオン性脂質組成物、特に一価および多価カチオン性脂質組成物、より詳細には、「LIPOFECTIN」、「LIPOFECTACE」、「LIPOFECTAMINE」、「CELLFECTIN」、DMRIE-C、DMRIE、DOTAP、DOSPA、およびDOSPER、ならびにデンドリマー組成物、特にG5〜G10デンドリマー（デンススターデンドリマー、PAMAMデンドリマー、グラフト化デンドリマー、ならびにデンドリグラフト（dendrigrfts）および「SUPERFECT」として公知のデンドリマーを含む）である。

20

第2の特定のトランスフェクション法において、トランスフェクション増強ペプチドまたはタンパク質を核酸結合基、例えば、ポリアミンおよびより詳細にはスベルミンと結合体化して、改変ペプチドまたはタンパク質を生成する。これは、次いで、核酸に結合されて、細胞に導入される。次いで、改変ペプチド-核酸複合体は、トランスフェクション薬剤（またはその混合物）と混合されて、そして得られた混合物を利用して細胞をトランスフェクトする。特に、ペプチドまたはタンパク質をスベルミンに共有結合されて、スベルミン-改変ペプチドまたはタンパク質は、核酸と複合体化されて、そしてカチオン性脂質と混合される。好ましいトランスフェクション薬剤は、カチオン性脂質組成物、詳細には一価および多価カチオン性脂質組成物、より詳細には、「LIPOFECTIN」、「LIPOFECTACE」、「LIPOFECTAMINE」、「CELLFECTIN」、DMRIE-C、DMRIE、DOTAP、DOSPA、およびDOSPER、ならびにデンドリマー組成物、特にG5〜G10デンドリマー（デンススターデンドリマー、PAMAMデンドリマー、グラフト化デンドリマー、ならびにデンドリグラフトとして公知のデンドリマーを含む）である。

30

40

第3の特定の実施態様において、1つ以上のトランスフェクション増強ペプチド、タンパク質、またはタンパク質フラグメント（融合誘導ペプチドもしくはタンパク質、輸送またはトラフィックペプチドもしくはタンパク質、レセプター-リガンドペプチドもしくはタンパク質、または核局在ペプチドもしくはタンパク質および/あるいは、それらの改変アナログ（例えば、スベルミン改変ペプチドもしくはタンパク質）またはその組合せを含む）の混合物は核酸と混合されて、複合体化され、細胞に導入される。次いで、ペプチド-核酸複合体をトランスフェクション薬剤と混合して、そして得られた混合物を利用して細胞をトランスフェクトする。

50

別の特定の実施態様において、トランスフェクション薬剤（脂質、カチオン性脂質、またはデンドリマー）の成分は、選択されたペプチド、タンパク質、もしくはタンパク質フラグメントに直接あるいは連結基またはスペーサー基を介して共有結合される。本発明の実施態様において特に目的のものは、融合誘導、膜透過性、輸送もしくはトラフィックティング、または細胞標的化について機能するペプチドまたはタンパク質である。ペプチドまたはタンパク質トランスフェクション薬剤複合体は、核酸と合わされて、そしてトランスフェクションに使用される。

本発明のトランスフェクション組成物および方法は、細胞、特に真核生物細胞のインビトロおよびインビボトランスフェクションに、そしてより詳細には、高等真核生物細胞（動物細胞を含む）のトランスフェクションに適用され得る。本発明の方法は、有用な遺伝子産物を発現するトランスフェクトされた細胞を産生するために用いられ得る。本発明の方法はまた、トランスジェニック動物の作製の工程として使用され得る。本発明の方法は、遺伝子治療およびウイルス阻害の方法、ならびにアンチセンスもしくは抗遺伝子核酸またはリボザイムもしくはRNA調節配列または関連した阻害性核酸もしくは調節核酸の細胞への導入のための方法を含む、細胞への核酸の導入を必要とする任意の治療方法における工程として有用である。特に、これらの方法は、インビボおよびエキソビボ遺伝子治療における癌処置において、ならびに診断方法において有用である。

ペプチド、タンパク質、ペプチドもしくはタンパク質フラグメントまたは改変ペプチドもしくは改変タンパク質を含む、本発明のトランスフェクション組成物および方法はまた、研究目的でなされた真核生物細胞の任意のトランスフェクションにおける研究試薬として利用され得る。トランスフェクション組成物は、生理学的な媒体を適切に選択することによって、治療適用および診断適用に用いられ得る。

本発明のトランスフェクション薬剤およびトランスフェクション増強薬剤は、治療的適用のための種々の薬学的組成物および投薬形態で提供され得る。例えば、注射用処方物、鼻腔内処方物ならびにこれらの複合体を含む静脈内および/または病巣内投与のための処方物が、治療に使用され得る。

一般的に、本発明の薬学的組成物は、十分なトランスフェクション薬剤および任意の増強薬剤（ペプチド、タンパク質など）を含み、標的細胞または標的組織への十分に高レベルの核酸の導入を提供する。その結果、核酸は、そこでの所望の治療的効果を有する。治療的に有効な標的細胞または標的組織での核酸のレベルは、阻害の効率または他の生物学的機能および核酸が影響を及ぼさねばならない部位の数に依存する。

患者に投与されるトランスフェクション薬剤の投薬量は、方法および投与部位、患者の年齢、体重および状態を含む多くの他の因子に依存する。当業者は、所定の型の投与、所定の患者、および所定の治療適用のための投薬量を容易に調整し得る。

トランスフェクション組成物は、最小量の阻害成分（例えば、血清または高い塩レベル）を含むべきであることが当業者に理解される。この阻害成分は、細胞への核酸の導入を阻害し得、またはそうでなければ、トランスフェクションまたは核酸の複合体化を妨げる。任意の薬学的または治療用組成物は、特定の適用に依存して、患者に有害な副作用を生じ得る最小量の成分を含むべきであることが当業者に理解される。

本発明のトランスフェクション組成物の成分は、試薬キットにおいて提供され得る。一般的には、キットは、トランスフェクション薬剤およびトランスフェクション増強ペプチド、タンパク質またはそのフラグメントを含む。1つの実施態様において、キットは、カチオン性脂質およびペプチド、タンパク質もしくはそのフラグメント、または改変ペプチド、改変タンパク質もしくはそのフラグメントの個々の部分を含む。第2の実施態様において、キットは、デンドリマーおよびペプチド、タンパク質もしくはそのフラグメントまたは改変ペプチド、改変タンパク質もしくはそのフラグメントの個々の部分を含む。カチオン性脂質トランスフェクションキットは、必要に応じて、中性脂質ならびに他のトランスフェクション増強薬剤または他の添加剤を含み得、そしてキットにおける成分の相対的量は、をトランスフェクション組成物の調製を容易にするために調整し得る。キットの成分は、適切な媒体または他のキット成分のための溶媒を含み得る。中性脂質および改変ペ

10

20

30

40

50

チドまたはタンパク質を含む一価カチオン性または多価カチオン性脂質組成物を含む、カチオン性脂質トランスフェクションキットが好ましい。デンドリマートランスフェクションキットは、必要に応じて、例えば、DEAEデキストランおよび/またはクロロキンのような他のトランスフェクション増強薬剤、ならびに他の添加剤を含み得る。そしてキット中の成分の相対的な量は、トランスフェクション組成物の調製を容易にするために調整され得る。ペプチドもしくはタンパク質または改変ペプチドもしくは改変タンパク質と組み合わせて、G5-G10デンドリマーまたはリジンもしくはアルギニン改変デンドリマーまたはデンドリグラフトあるいは活性化されたデンドリマーを含む、デンドリマートランスフェクションキットが好ましい。本発明により提供されるキットは、DOSPAおよびDOPEを含む多価カチオン性脂質組成物またはDOTMAおよびDOPE、ならびに改変ペプチド（特にスベルミン改変ペプチド）の一部分を含む一価カチオン性脂質組成物の個々の一部分を含むものを含む。本発明により提供されるキットは、デンドリマーの個々の一部分およびスベルミン改変ペプチドの一部分を含むものを含む。

10

関連した実施態様において、本発明のキットは、非結合型脂質、非結合型デンドリマー（dendrimer）およびトランスフェクションを容易にする他の薬剤と組み合わせて、ペプチド-脂質結合体もしくはタンパク質-脂質結合体またはペプチド-デンドリマー結合体もしくはタンパク質-デンドリマー脂質結合体を包含し得る。

本発明のキットは診断方法に有用なキットを含み得る、例えば、診断用キットは、トランスフェクション試薬およびトランスフェクション増強試薬（例えば、タンパク質、ペプチドならびにタンパク質およびペプチドのフラグメントおよび改変体）に加えて、診断用核酸を含み得る。診断用核酸は細胞中の別の物質の存在を検出するために使用され得る任意の核酸についての一般用語である。例えば、細胞中にトランスフェクトされる場合、診断用核酸は、細胞中の別の物質（例えば、タンパク質、低分子、ステロイド、ホルモン、または別の核酸）の存在にตอบสนองして細胞中の遺伝子の発現を増加または減少し得る。診断用核酸はまた、特定の標的細胞もしくは特定の標的組織に対する、または標的細胞もしくは標的組織の検出のための、または標的細胞もしくは標的組織中の物質の検出のための、いくつかの標識、またはさもなければ検出マーカーを保有する核酸を含む。

20

本発明の方法によってトランスフェクトされ得る核酸には、天然の塩基または天然ではない塩基を含む任意の供給源由来の任意のサイズのDNAおよびRNAが含まれ、そして細胞中において治療用タンパク質またはさもなければ有用なタンパク質をコードして発現し得る核酸、細胞中において核酸の所望ではない発現を阻害する核酸、所望ではない酵素活性を阻害するかまたは所望の酵素を活性化する核酸、反応を触媒する核酸（リボザイム）、および診断アッセイにおいて機能する核酸（例えば、診断用核酸）が含まれる。治療用核酸には、細胞中において治療的に有用なタンパク質、ペプチド、またはポリペプチドをコードするかまたは発現し得る核酸、細胞中において核酸の所望ではない発現を阻害する核酸、細胞中において所望ではない酵素活性を阻害するかまたは所望の酵素を活性化する核酸が含まれる。

30

本明細書中に提供される組成物および方法はまた、本明細書の開示を参照して容易に適合され得、とりわけポリアミン、ポリアミン酸、ポリペプチド、およびタンパク質を含む核酸以外の生物学的に活性な巨大分子を、真核生物細胞に導入し得る。例えば、治療剤として、診断用物質として、研究試薬として有用な他の物質は、ペプチドおよび改変されたペプチドに結合され得、そしてならびに本発明の方法によって真核生物細胞中に導入され得る。

40

【図面の簡単な説明】

図1は、「LIPOFECTAMINE」-DNAトランスフェクション混合物に添加された種々のペプチドでのヒト線維芽細胞の、トランスフェクションの増強を示す棒グラフである。

図2は、「LIPOFECTAMINE」トランスフェクション活性の増強におけるSp-NLSNLS濃縮物の効果を示すグラフである。ヒト線維芽細胞は、無血清培地中において、示されるように0.4 μ g DNA、2 μ L「LIPOFECTAMINE」およびSp-NLSNLSでトランスフェクトされる。細胞は、トランスフェクションの24時間後に回収され、そして β -ガラクトシダーゼ活性につい

50

てアッセイされる。

図3A～3Hは、4つの細胞型において、DNAと予め複合体化したSp-NLSNLSとの脂質トランスフェクションおよびそれを伴わない脂質トランスフェクションの比較を提供する。ヒト線維芽細胞（3Aおよび3B）；BHK-1細胞（3Cおよび3D）；NIH 3T3細胞（3Eおよび3F）；MDCK細胞（3Gおよび3H）は、24ウェルプレートにおいて、示されるように「LIPOFECTAMINE」およびDNAでトランスフェクトされた。図3A、C、EおよびG：Sp-NLSNLSなし；図3B、D、FおよびH：予めDNAと複合体化された1～4 μg Sp-NLSNLS/ウェル。

図4Aおよび4Bは、変化する量のSp-NLSNLS存在下で、変化する量のDNA（pSVneo）での「LIPOFECTAMINE」トランスフェクションと、ペプチドを伴わないトランスフェクションとを比較する3次元グラフである。トランスフェクションはNIH 3T3細胞で行われた。

10

発明の詳細な説明

本発明は、ペプチド、タンパク質またはそのフラグメント、改変されたペプチド、もしくは改変されたタンパク質、またはその改変されたフラグメントを、トランスフェクト試薬（例えば、カチオン性脂質およびデンドリマー）と組み合わせて使用することによって、任意の細胞（好ましくは、真核生物細胞）を核酸でトランスフェクションするための改良された方法を提供する。本改良は、1つの局面において、カチオン性脂質媒介トランスフェクションもしくはデンドリマー媒介トランスフェクションの効率を増強するための、ペプチド-核酸複合体、またはタンパク質-核酸複合体の使用に関する。ペプチド-核酸複合体、またはタンパク質-核酸複合体は、核酸に結合したペプチド、または核酸結合基と共有結合されて次いで核酸に結合されるように改変されたペプチドを含む。あるいは、

20

ペプチドまたはタンパク質は、核酸-トランスフェクション試薬複合体と組み合わせて使用される。本発明は、トランスフェクションのためにカチオン性脂質またはデンドリマーを利用する先行技術方法のトランスフェクションを超える、有意な利点を有する。本発明のペプチドには、とりわけ、融合誘導（fusagenic）ペプチド、膜透過化ペプチド、輸送またはトラフィッキングペプチド、核局在化ペプチド、およびレセプター-リガンドペプチドが含まれる。レセプター-リガンドペプチドには、とりわけ、細胞接着ペプチド、細胞標的ペプチド、インターナリゼーション誘発ペプチド、およびエンドサイトーシス誘発ペプチドが含まれる。本発明において有用なペプチドには、融合のために機能するペプチド配列（融合誘導配列）、輸送のために機能するペプチド配列、細胞内局在のために機能するペプチド配列、またはレセプターへの結合を媒介するペプチド配列が含まれ得る。ペプチドには、ポリペプチドまたはタンパク質の機能性フラグメントであるペプチドが含まれ得、そして合成物、あるいは合成タンパク質もしくは操作されたタンパク質または合成ポリペプチドもしくは操作されたタンパク質由来であり得る。ペプチドは、これらの機能の1つより多くを有する配列を含む、多機能性であり得る。必要に応じて、ペプチドは核結合基（ポリアミンを含む）に共有結合され、そして核酸と複合体を形成する。ペプチド複合体化核酸は、より効率的に細胞および細胞核に輸送され、次いで、カチオン性脂質媒介細胞トランスフェクション、またはデンドリマー媒介細胞トランスフェクションの効力を増強する。トランスフェクションの改良された効力のために、かなりより少数の核酸が有効なトランスフェクションに必要とされる。本発明のトランスフェクション組成物は、核酸とペプチドまたは改変されたペプチドとの間の複合体形成のおかげで、先行技術のカチオン性脂質トランスフェクション組成物およびデンドリマー

30

40

トランスフェクション組成物と比較した場合、増強されたトランスフェクションを提供する。本発明のタンパク質には、とりわけ融合誘導タンパク質、膜透過化タンパク質、輸送またはトラフィッキングタンパク質、核局在化タンパク質、およびレセプター-リガンドタンパク質が含まれる。レセプター-リガンドタンパク質には、とりわけ、細胞接着タンパク質、細胞標的タンパク質、インターナリゼーション誘発タンパク質、およびエンドサイトーシス誘発タンパク質が含まれる。本発明において有用なタンパク質には、融合のために機能するペプチド配列（融合誘導配列）、輸送のために機能するペプチド配列、細胞内局在のために機能するペプチド配列、またはレセプターへの結合を媒介するペプチド配列が含まれ得る。タンパク質には、ポリペプチドまたはタンパク質の機能性フラグメントであ

50

るタンパク質が含まれ得、そして合成タンパク質もしくは操作されたタンパク質であり得るか、または合成ポリペプチドもしくは操作されたポリペプチドを含む。タンパク質はこれらの機能の1つより多くを有する配列を含む、多機能性であり得る。必要に応じて、タンパク質は核結合基（ポリアミンを含む）に共有結合され、そして核酸と複合体を形成する。タンパク質複合体化核酸は、より効率的に細胞および細胞核に輸送され、次いで、カチオン性脂質媒介細胞トランスフェクション、またはデンドリマー媒介細胞トランスフェクションの効力を増強する。トランスフェクションの改良された効力のために、かなりより少数の核酸が有効なトランスフェクションに必要とされる。本発明のトランスフェクション組成物は、核酸とタンパク質または改変されたタンパク質との間の複合体形成のおかげで、先行技術のカチオン性脂質トランスフェクション組成物およびデンドリマー トランスフェクション組成物と比較した場合、増強されたトランスフェクションを提供する。本発明の別の局面は、ペプチド結合体またはタンパク質結合体を用いる、トランスフェクションの改良された効力に関する。ここで、選択されたペプチド（タンパク質またはタンパク質フラグメント）は、カチオン性脂質トランスフェクション組成物中の成分である、デンドリマーまたは脂質と共有結合されている。ペプチド結合型トランスフェクション試薬、またはタンパク質結合型トランスフェクション試薬は、次いで非結合型トランスフェクション試薬について当該分野で公知のように、トランスフェクションに使用される。

以下の定義は本明細書および請求の範囲において使用される。

用語「トランスフェクション」は、本明細書中、概して、核酸が細胞内でその機能を保持するような様式での、細胞（例えば真核細胞）への生物学的に機能的な核酸の送達および導入を意味する。本発明のトランスフェクション法は、インビトロまたはインビボにおいて細胞に適用され得る。用語、トランスフェクションは、細胞が核酸を発現させる能力を与えられるように、発現可能な核酸の細胞への送達および導入という、より特定の意味を含む。用語、発現は、細胞内の核酸の機能的存在の任意の徴候を意味し、これは一過性の発現および安定した発現の両方を含む細胞内の核酸は、天然の塩基および非天然の塩基を含む任意の供給源からのDNAおよびRNAの両方を含み、サイズの限定はない。核酸は、様々な生物学的機能を有し得る。核酸は、タンパク質をコードし得、調節領域を含み、遺伝子またはRNA発現のインヒビター（例えば、アンチセンスDNAまたはアンチセンスRNA）として機能し、タンパク質のインヒビターとして機能し、細胞成長を阻害または細胞を殺すように機能し、反応を触媒し、または診断もしくは他の分析アッセイにおいて機能する。

トランスフェクション効率は、本明細書の実施例に記載する核酸の生物学的機能を測定するためのプロトコルを用いて、効率において少なくとも約5パーセント、好ましくは約10パーセント、およびより好ましくは約20パーセントの改良が示される場合に、「増強される」。トランスフェクションは、本明細書に記載されるように、少なくとも約2倍（すなわち100%以上）の効率の改良が測定される場合に、実質的に増強される。

用語「核酸結合基」は、本明細書では一般的に、タンパク質、ペプチド、ポリペプチド、またはポリアミンを意味するために用いられ、これは非共有的に核酸と会合し得る。核酸結合基はDNA結合基を含む。核酸結合基の核酸への結合は、核酸の配列の特異的であり得るか、またはその配列に非特異的であり得る。会合の機構は特定の結合基に依存するが、配列特異性は一般に、結合基とその標的DNAとの間のお互いに有利な相互作用の凝集体から生じる。いくつかのDNA結合基は、例えば、DNAの塩基対および糖リン酸鎖と、直接的な接触（水素結合、塩橋およびVan der Waals力を含む）を介して相互作用する。他の基は、核酸とタンパク質との間の配列特異的水素結合相互作用よりも、DNA（または、より一般的には核酸）中の配列特異的な構造変化を介して機能する。用語、「核酸結合基」には、結合機構に関することなく核酸と結合し得る任意のタンパク質、ペプチド、ポリペプチドまたはポリアミンが含まれると理解される。核酸結合基は当該分野において公知であり、そして広範に市販されている。

用語「ペプチド」とは、本明細書中で使用される場合、広範には短ペプチド（代表的には100アミノ酸未満）を含む総称であることが意図される。また、本明細書中で一般的に使用されるペプチドには、核酸結合基で改変されたペプチド、またはMtr基のようなアミノ

10

20

30

40

50

酸保護基を保持するペプチドが含まれる。より長いポリペプチド（代表的には100アミノ酸を超える）、およびトランスフェクション増強剤として機能する1つ以上のポリペプチド鎖を含むタンパク質（これはフサンジェリック、細胞レセプターリガンド、輸送または細胞内局在機能を有する）は、本発明のペプチドで置換され得、そしてまた核酸結合基で改変され得る。本発明のペプチドは、代表的には2つ以上のアミノ酸を有する；好ましいペプチドは4つ以上のアミノ酸を有する。

本発明のペプチドは、フサンジェリックペプチド、膜透過性ペプチド、細胞内局在ペプチド、細胞輸送、およびレセプターリガンドペプチドとしての生物学的機能を有する。2つ以上のペプチド機能は、例えば自動ペプチド合成機によって同一のペプチドに組み合わせられ得る。ペプチドには二量体、多量体、および1つ以上の所望の機能性を有するペプチド配列の混入体（contamimer）が含まれる。

10

用語、スぺルミンは、分子スぺルミンを記載するために使用されるが、スぺルミンと共有結合するように改変されたペプチドを記載するためにもまた、用語「スぺルミンー改変」ペプチドとして使用される。スぺルミンは、介在性共有結合を介してペプチドと直接的または間接的に結合され得る。スぺルミンー改変ペプチドは、一般的にスぺルミンに対するリンカーを有する改変型ペプチドを記載するために使用され得る。例えば、用語、スぺルミンー改変はまた、カルボキシスぺルミンと結合したペプチドをいう。

本発明のレセプターリガンドタンパク質またはペプチドには、ペプチド、タンパク質、またはタンパク質フラグメントが含まれ、これらは細胞表面もしくは他の膜に結合する、または可溶性レセプター分子に結合する、ならびに必要に応じて別の生物学的機能を有し、そして必要に応じてインターナリゼーションもしくはエンドサイトーシスを誘発する。レセプターリガンド結合タンパク質またはペプチドには、細胞接着タンパク質または細胞接着ペプチド、および細胞標的化タンパク質または細胞標的化ペプチドが含まれる。

20

レセプターリガンドタンパク質またはレセプターリガンドペプチドには、接着タンパク質または接着ペプチドもまた含まれる。接着タンパク質または接着ペプチドは、代表的にはエンドサイトーシスを誘発しない。接着タンパク質または接着ペプチドは、フィブロネクチン、ビトロネクチン、テネイシン、ラミニン、コラーゲン、トロネボスポンジン、フィブリノーゲンおよび機能性等価物を含む接着タンパク質を含むかもしくはこれらのタンパク質由来であり得る。このようなレセプターリガンドペプチドはまた、「RETRONECTIN」（Takara, Japanから入手可能；米国特許第5,198,423号を参照のこと、これは本明細書中においてその全体が参考として援用される）のようなフィブロネクチンフラグメントを含むがこれらに限定されない、接着タンパク質のフラグメントを含む。表1は接着タンパク質およびペプチドの例を提供する。

30

接着タンパク質のフラグメントには、表1に列挙されるように、RGD配列含有ペプチド（RGDペプチド）が含まれる。CS-1ペプチド（表1に挙げられる配列）は、カルボキシ末端ヘパリンIIドメインおよびIII型連結セグメント（IIICS）の一部を含む血漿フィブロネクチンの代表的な38kDのフラグメントから得られる（Wayner, E.A.ら、（1989）「Identification and Characterization of T Lymphocyte Adhesion Receptor for an Alternative Cell Attachment Domain (CS-1) in Plasma Fibronectin」J. Cell Biol. 109:1321-1330）。レセプターリガンドタンパク質またはレセプターリガンドペプチドはまた、インターナリゼーションおよび／またはエンドサイトーシスを誘発するものを含む。例えば、ペントン基部とは、アデノウイルスの5量体コートタンパク質であり、これはインテグリンレセプター結合モチーフである、Arg-Gly-Asp (RGD) の5個のコピーを含む。ペントン基部は、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ および $\alpha_v\beta_5$ に結合するウイルスによって使用される。ファイバーコートタンパク質によるアデノウイルスの細胞接着の後、インテグリンレセプターはウイルスの宿主細胞内へのインターナリゼーションを媒介する。ペントン基部（野生型）RGD配列は、HAIRGDTFATである（Wickham, T.J.ら、（1995）Gene Therapy 2:750-756）

40

接着ペプチドには、RGDペプチド（これは重複し得るか、またはフィブリノーゲンもしくはビトロネクチンの効果を促進する細胞接着を阻害し得るトリペプチド配列Arg-Gly-Aspを含むペプチドである）あるいは、類似の結合モチーフを有する他のペプチドである。

50

本発明のレセプターーリガンドタンパク質またはレセプターーリガンドペプチドは、種々の細胞型において広範に発現されるレセプター分子に親和性もしくは結合性を有するタンパク質またはペプチド（例えば、インテグリン $\alpha_v\beta_5$ に結合するようなタンパク質またはペプチド）を含む。本発明のレセプターーリガンドペプチドはまた、限定された数の細胞型において特異的に発現されるレセプター分子（例えば、組織特異的）、もしくは特定の細胞型において高度に発現されるレセプター分子（例えば、ガン細胞において、インテグリン $\alpha_v\beta_5$ （これは特定のメラノーマおよび神経膠芽細胞腫において高度に発現される）に結合するようなもの）に結合する、タンパク質またはペプチドが含まれる。

細胞内局在化タンパク質またはペプチドには、特定の非細胞成分（例えば、核、ミトコンドリアなど）を認識する、標的するもしくは指向するタンパク質またはペプチドが含まれる。C.Dingwallら、(1991) TIBS 16:478-481を参照のこと。

いくつかのタンパク質は、真核生物細胞内への輸送またはトラフィックングに関することが示されている。これは、細胞内成分の適切な区画への送達のための重要な細胞機能である。逆方向に細胞膜を横切りそして核に到達する能力を有するタンパク質には、インターロイキン-1 β 、HIV Tatタンパク質、酸性もしくは塩基性線維芽細胞成長因子、アンジオゲニン、ホメオタンパク質アンテナペディア (homeoprotein Antennapedia)、神経鞘腫由来成長因子、および単純ヘルペスウイルスVP22タンパク質が挙げられる。これらのタンパク質は、細胞膜を横切って核に到達し得る。これらのタンパク質の2つである、HIV-TatおよびHSV-VP22はまた、融合物として合成された場合、他のタンパク質の取り込みを媒介することが示されている。Tatタンパク質の輸送機能は11~12アミノ酸ペプチドの内に含まれることが示されており、そしてこれらのペプチドを有する異種タンパク質の融合物は細胞内に輸送された。(Vives,E.ら、(1997)、「A truncated HIV-1 tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus,」J.Biol.Chem.272:16010-16017;Kirsch,T.ら、(1996)、「Cloning, high yield expression in Escherichia coli, and purification of biologically active HIV-1 Tat protein,」Protein Expr.Purif.8:75-84;Bonifaci,N.ら、(1995)、「Nuclear translocation of an exogenous fusion protein containing HIV Tat requires unfolding,」AIDS 9:995-1000;Fawell,S.ら、(1994)、「Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells,」Proc.Natl.Acad.Sci. (USA) 91:664-668;Pepinsky,R.B.ら、(1994)、「Specific inhibition of a human papillomavirus E2 Trans-activation by intracellular delivery of its receptor,」DNA and Cell Biol.13:1011-1019;Mann,D.A.およびFrankel,A.D. (1991)、「Endocytosis and targeting of exogenous HIV-1 Tat protein,」EMBO J.10:1733-1739;Frankel,A.D.ら、(1989)、「Activity of synthetic peptides from the Tat protein of human immunodeficiency virus type I,」Proc.Natl.Acad.Sci. (USA) 86:7397-7401)。

最も一般的には、表1~3に例示された配列のいずれか、またはその機能性等価物が、本発明のトランスフェクション組成物もしくは方法においてトランスフェクション活性を増強させるペプチドまたは改変ペプチドとして、使用される。スベルミン改変ペプチドの詳細な例については、表4において提供される。

表2は、本発明において有用である種々のペプチドを列挙する。これには1つの機能性領域を有するペプチド、および2つ以上の機能性領域を組み合わせたペプチドが含まれる。単一の機能性ペプチドのコンカテマー、および二重（以上）の機能性ペプチド配列反復を組み合わせたコンカテマーが列挙され、そして本発明において有用である。表2のペプチド式は、一般領域、例えば、特定の機能に関連して保存されたアミノ酸配列を有するペプターおよび連結基を組み合わせる。機能性ペプチドの二量体および多量体、例えば、ペプチドの2つのシステイン残基の間で形成された二量体は、表2において特に列挙されていない。機能性ペプチドの二量体および多量体は、本発明において有用である。

表2はまた、環状ペプチドおよび環状ペプチドのシステインペプチド前駆体（これらは本発明の機能性ペプチド配列（NLS、VSVG、RGD、LDV、E5、K5、など）を含む）を列挙する。

。

10

20

30

40

50

表3は、トランスフェクションの増強のための、本発明の方法および組成物に有用である、多数の特異的なペプチド配列を提供する。表は、任意のスペーサーおよび任意のカチオン性テイル（核酸への結合のため）を有する、2つの機能性ペプチド配列の多数の特異的組合せを含む。表の1つの項目である、「NLSリン酸化」とは、リン酸化部位含有配列に結合されたNLS配列をいう。この融合物は、H-P.Rihsら、(1989) EMBO J.8:1479-1484およびH-P Rihsら、(1991) EMBO J.10:633-639に記載されている。リン酸化部位の存在は核への輸送を増強する。

表3はまた、トランスフェクション増強ペプチドである、HIS-TEV-ペプチドに対する前駆体を含む。これらのペプチドは、トランスフェクション増強に有用なペプチド配列に加えて、HISテイル、およびTEV（タバコエッチウイルス（Tobacco Etch Virus））プロテアーゼ認識配列を含む。TEVプロテアーゼは、機能性ペプチド配列を残したままのペプチドから、HISテイルを特異的に切断する。この組合せは、米国特許第5,532,142号（これは本明細書中において参考として援用される）に記載されるように、融合ポリペプチドの単離および精製に使用され得る。HISテイルを有するペプチドは、Niカラムにおいて選択的に精製され得る。

表3はまた、 $(D)_n$ テイル、すなわち、アニオン性アミノ酸のテイルを有するペプチドの例を含む。これらのペプチドは、正に荷電した脂質-核酸凝集体の表面に結合して凝集体およびその中に保有される核酸のトランスフェクションを増強するための特定の目的のものである。アニオン性テイルを有するこれらのペプチドを使用するための1つのトランスフェクション法は、従来法による核酸を有するカチオン性脂質凝集体の初期形成、続くアニオン性テイルペプチドへの複合体形成に関する。アニオン性テイルを有するこれらのペプチドを使用する、第2のトランスフェクション法は、アニオン性ペプチドテイルの脂質への複合体化、続くDNAの添加に関する。これらのペプチドはまた、デンドリマー-核酸複合体を用いて使用され得る。

当業者には、表1、2および3に列挙されるような機能性ペプチドまたは改変ペプチドにおけるアミノ酸配列の改変が、機能的な重大な損失を伴うことなく容認され得ることは明らかである。多くの場合、類似のアミノ酸の置換、例えば、塩基性（カチオン性）アミノ酸の塩基性アミノ酸（例えば、KのR、またはRのK）との置換、あるいは酸性（アニオン性）アミノ酸の酸性アミノ酸との置換は、所定の機能ペプチドにおいて、ペプチド機能に有意に影響しない。類似のアミノ酸の弦線を含む機能性ペプチド（例えば、PKKKRKV）において、その弦線からの1つ以上のアミノ酸の付加または欠失（例えば、PKKKKKRKV）が、ペプチド機能の有意な欠損を伴うことなく容認され得る。

一般に、保存的アミノ酸置換または類似のアミノ酸の置換は、タンパク質またはペプチドの機能に影響を与えることなしに許容される。類似のアミノ酸は、大きさおよび/または荷電特性において類似するアミノ酸であり得、例えば、リジンおよびアルギニン、アスパラギン酸およびグルタミン酸、ならびにイソロイシンおよびバリンは、類似のアミノ酸の対である。アミノ酸対の間の類似性は、多くの方法で当該分野で、評価されている。例えば、Dayhoffら、(1978) Atlas of Protein Sequence and Struture、第5巻、補遺3、第22章、345~352頁（これは、本明細書中で参考として援用される）は、アミノ酸類似性の基準として使用され得るアミノ酸置換の度数表を提供する。Dayhoffらの度数表は、種々の進化的に異なる供給源由来の同様の機能を有するタンパク質のアミノ酸配列の比較に基づく。さらに、細胞結合、接着、細胞インターナリゼーション、膜透過化、核局在化および類似の機能を有する本発明の所定のペプチド、タンパク質、またはそのフラグメントについて、現在特定のデータがあり得、ペプチドおよび/またはタンパク質の機能に影響を与えないアミノ酸置換の点から当該分野で容易に使用可能である。表および本明細書中の記載に列挙されているようなペプチド、タンパク質およびそのフラグメントに類似のまたは保存されたアミノ酸置換を有する全てのこのようなペプチド、タンパク質およびそのフラグメントは、本発明に包含され、そして本発明の組成物および方法において有用である。本明細書の表中に列挙されるかまたは、本明細書中に記載されるペプチド、タンパク質およびそのフラグメントと例えば、細胞結合、細胞接若、細胞インターナリゼーション、

10

20

30

40

50

膜透過化、核局在化および類似の機能について類似の機能または同一の機能を有するペプチド、タンパク質およびそのフラグメントはまた、本発明の組成物および方法において使用され得る。

例示されるかまたは当該分野で公知の機能性ペプチドまたはタンパク質配列から最小に分歧する変化が、一般に好ましい。本発明での使用のために、機能性ペプチドは、コアペプチド配列の機能に影響を与えない、一連の隣接アミノ酸（好ましくはグリシン）を含み得る。類似方法において、本発明の機能性ペプチド配列は、より大きなペプチドまたはタンパク質内に包含され得、ここで、コア機能性配列に対して外側の配列の性質は、コアの機能に影響を与えない。本発明は、1つを超える別の機能性配列（例えば、NLSVSVGまたはRGDNLS）を含むペプチドを含む。これらのペプチドにおいて、機能性配列はリンカーペプチド領域（好ましくは1つを超えるG）によって隔てられ得る。本発明のペプチドは、別の種への化学的結合のための部位を提供するためのペプチド（例えば、システインはスベルミンへの結合のための部位として使用され得る）に付加され得る、機能性領域の部分でないアミノ酸を含み得る。いくつかの場合において、機能性コア配列に対して外部のアミノ酸は、機能性ペプチドと、それが共有結合する種（脂質、デンドリマー、ポリアミン、スベルミンなど）との間のスペーサーまたはリンカ領域として作用し得る。これらのアミノ酸は、ペプチドの最適配置において機能し得る。例えば、ペプチド中に含まれるシステイン残基は、酸化によって、-S-S-二量体またはより大きな多量体（3量体など）を形成するために酸化され得る。ペプチド中にお互い遠く離れて配置される2つのシステインは、1つ以上の機能性アミノ酸配列を含む環状ペプチドを調製するために酸化され得る。より高い安定性を有する異種二量体は、システインの代わりにペニシラミン（Pen）を取り組むことによって形成され得る（Pierschbacherら、（1987）J.Biol.Chem.262）。

本発明はまた、トランスフェクションを増強する官能基を含むペプチドまたはタンパク質を含み、そしてまたペプチドおよびタンパク質自体の調製、単離および精製において有用であるアミノ酸またはアミノ酸配列を含む。例えば、芳香族アミノ酸はUV吸収マーカを提供するようにペプチドまたはタンパク質配列に含まれて、ペプチドまたはタンパク質濃度の便利な測定を可能にし得る。あるいは、トランスフェクション増強ペプチドおよびタンパク質は、ペプチドまたはタンパク質精製を容易にするための特定のカラム材料に特異的に結合するアミノ酸配列を提供され得る。特定のトランスフェクション増強ペプチドまたはタンパク質は、細菌または他の発現系におけるDNAの発現によってさらに容易に産生され得る。本発明のペプチドまたはタンパク質は、発現系からのペプチドまたはタンパク質の単離において有用である選択的プロテアーゼについての部位であるアミノ酸配列（またはそれらの部分）を含み得る。

用語「改変ペプチド」および「改変タンパク質」は、一般に、ペプチドまたはタンパク質が、それ自身へ共有結合する核酸結合基を含むように化学的に改変されたペプチドまたはタンパク質を意味するように本明細書中で使用される。本明細書中で使用されるように、用語「改変ペプチド」は、「ポリアミン-ペプチド結合体」を含み、ここで、共有結合した核酸結合基、より詳細には共有結合したDNA結合基はポリアミンであり、「スベルミン-改変ペプチド」を含み、ここで、DNA結合基はスベルミンである。いくつかの場合には、ペプチドまたはタンパク質は、それら自体が核酸に結合し得る；他の場合には、核酸への結合のため、または核酸への結合を増強させるためにペプチドの改変が必要となる。例えば、一連のカチオン性アミノ酸が、核酸への結合を容易にするように機能性ペプチドに（C末端またはN末端で）付加され得る。これらの配列は、（Uaa）、として記載され得、ここで、uは代表的には、1～約20の範囲（そしてより好ましくは、8～20の範囲）の整数であり、そしてUaaは、ペプチド中の他のUaaと独立して、カチオン性アミノ酸（例えば、（K）_u、（R）_u、または（KR）_u）である。より一般的には、核酸への結合のための一連のカチオン性アミノ酸は、結合機能が有意に減少しない限り、非カチオン性アミノ酸（好ましくはG）を含み得る。

天然に存在するペプチドまたはタンパク質は、スベルミンまたは他のポリアミンへの結合を可能にするようにさらなる改変を要求し得る。例えば、システインは、ペプチドのC末

10

20

30

40

50

端またはN末端に付加され得るか、または結合を容易にするようにペプチド内へ導入され得る。一連のスペーサーアミノ酸と同様に（すなわち $(G)_n$ は、（ここでnは、最も一般的には1～約20の範囲の整数である）ペプチドと、それが結合する種との間に付加され得る。結合を容易にするために使用される任意のペプチド改変は、好ましくはペプチドの結合または機能に実質的に影響を与えない。

用語「ペプチド核酸複合体」は、概して、ペプチドまたはタンパク質と核酸との間の非共有結合物をいう。この複合体のペプチドまたはタンパク質は、上記で定義したような改変ペプチドであり得る。トランスフェクション法の実施態様において本明細書中で用いられるように、「ペプチド-核酸複合体」は、トランスフェクション組成物に対するカチオン性脂質またはデンドリマー（dendrimer）の添加に先だって形成される。

「脂質凝集体」は、単層および多層の両方の全てのタイプのリポソーム、ならびに小胞、ミセルおよびより無定形の凝集体を含む包括的な用語である。カチオン性脂質凝集体は、必要に応じて、非カチオン性（例えば中性）脂質と組み合わせられた、脂質凝集体が賞味の電荷を有するために十分なカチオン性脂質を含む脂質凝集体である。カチオン性脂質および脂質凝集体は、本発明のペプチド-核酸複合体を集合させ得る能力を有する。

カチオン性脂質組成物は、一価のまたは多価のいずれのカチオン性脂質でもあり得る、カチオン性脂質またはカチオン性脂質の混合物を含む組成物を含む。カチオン性脂質組成物は、必要に応じて、中性脂質を含む。特に興味をひくのは、当該分野で、トランスフェクション法において有用であると認められるカチオン性脂質組成物である。好ましいカチオン性脂質組成物は、一価または多価のカチオン性脂質を含み；より好ましくは、DOTMA、DOTAP、DDAB、DMRIE、DOSPA、DOSPER、TMTPSおよびそれらのアナログまたは相同体を含む組成物であり；最も好ましいカチオン性組成物は、「LIPOFECTIN」および「LIPOFECTAMINE」である。

トランスフェクション活性または効率は、細胞内のトランスフェクトされた核酸の存在を検出することにより測定される。これは、しばしば、細胞内の核酸の生物学的機能を測定することにより評価され、最もしばしば、トランスフェクトされた核酸中に含まれるレポーター遺伝子の一過性のまたは安定した発現のレベルを測定することにより評価される。レポーター遺伝子の発現は、特に、トランスフェクトされた核酸の置および細胞内のプロモーター機能に依存する。トランスフェクション活性はまた、例えば、細胞計数方法カウントまたはインサイチュ染色方法を用いてレポーター遺伝子の発現を評価することによって、トランスフェクトされているサンプルの中の細胞の%を決定することにより評価され得る。カチオン性脂質と組み合わせたペプチドを用いる本発明のトランスフェクション法は、同等のカチオン性脂質のみを用いるトランスフェクションを超える有意なトランスフェクションの増強（2倍以上）を示し得る。

本発明の方法は、ペプチド-核酸複合体（または改変ペプチド-核酸複合体）およびトランスフェクション薬剤、カチオン性脂質またはデンドリマーを含むトランスフェクション組成物と真核生物細胞とを接触させる工程を含む。カチオン性脂質トランスフェクション組成物は、必要に応じて、非カチオン性脂質、好ましくは中性脂質を含む。カチオン性脂質トランスフェクション組成物は、必要に応じて、ペプチドまたは改変ペプチド（例えば、クロロキン、リソソーム作用剤（lysosomotropic agent）を含む）に加えて公知のトランスフェクション増強因子を含み得る。デンドリマーまたはその混合物は、トランスフェクション組成物において使用され得る。デンドリマートランスフェクション組成物は、デンドリマー媒介トランスフェクションを増強することが公知である、ペプチドまたは改変ペプチド以外の薬剤（例えば、DEAEデキストランおよび/またはクロロキン）を含み得る。ペプチドまたはタンパク質は、ウイルスの融合誘導ペプチドまたは融合誘導タンパク質であり得る。好ましい融合誘導ペプチドまたは融合誘導タンパク質は、インフルエンザウイルス赤血球凝集素または水疱性口内炎ウイルスGタンパク質（すなわち、VSVG）のものである。ペプチドまたはタンパク質は、細胞内局在化シグナルペプチドまたはタンパク質であり得る。好ましい核局在化シグナルペプチドは、シミアンウイルス40のものであり、特に、SV40ラージT抗原の核局在化配列（NLS）である（Kalderonら（1984）Cell 39:499

10

20

30

40

50

、およびLandfordら（1986）Cell 46:575）。DingwellおよびR.A.Laskey（1991）TIBS:478-481（これは、開示された配列のための参考として本明細書中で援用される）で報告されるように、核局在化シグナルの配列においてはいくらか多様性がある。本発明は、本明細書中で開示されるような核局在化配列を含むペプチドまたはタンパク質を含む。本発明のペプチドまたはタンパク質は、レセプターリガンドペプチドまたはタンパク質であり得る。好ましいレセプターリガンドペプチドは、細胞接着ペプチドであり、特にRGDペプチドまたは他のインテグリン結合ペプチドである。核酸結合基に結合されるウイルスタンパク質のペプチドまたはタンパク質を含むトランスフェクト組成物は、特に好ましい。好ましい核酸結合基は、スペルミンおよび一連のカチオン性アミノ酸（K）_uおよび（R）_u。（ここで、uは1～約20の整数であり、より好ましくは約8～約20の整数である）である。

本発明の増強されたトランスフェクション法は、シミアンウイルス40からの原型核局在化シグナルペプチドおよびインフルエンザからの原型核融合誘導ペプチド（HA_{pep}:E5およびK5両親媒性ペプチド）、水疱性口内炎ウイルスからの原型融合誘導ペプチド（Gタンパク質）、およびフィブロネクチンの細胞付着部位から採取されたRGDペプチド（GRGDSPC）で示される。用いられてきたDNA結合基は、核酸の塩基対との非共有結合（association）を形成し得るポリアミンである。本発明の増強されたトランスフェクション法を、原型DM結合基であるスペルミンを用いて更に例示した。

いくつかの場合には、ペプチドまたはタンパク質は、核酸との直接非共有結合（association）または複合体を形成する。このペプチド-核酸複合体は、ペプチドとDNAの塩基対との間のコンホメーションまたは電荷の相互作用の結果として形成される。ペプチド-核酸複合体は、適切な媒体中で自発的に形成される。これらのペプチド-核酸複合体を含むトランスフェクション組成物は、まず核酸とペプチドまたはタンパク質とを相互作用させ、次いで得られた複合体をカチオン性脂質組成物またはデンドリマーに添加することにより調製される。本発明のペプチドまたはタンパク質は、核酸結合基（改変ペプチド）に共有結合された場合、核酸との非共有結合（association）または複合体を形成し得る。この改変ペプチド-核酸複合体は、核酸結合基と核酸（DNAまたはRNA）との間のコンホメーションまたは電荷の相互作用の結果として形成される。例えば、原型スペルミン-ペプチド-核酸複合体は、スペルミンのアミンとDNAバックボーンのリン酸との間の電荷の相互作用の結果として形成されるようである。改変ペプチド-核酸複合体は、適切な媒体中で自発的に形成される。これらの改変ペプチド-核酸複合体を含むトランスフェクション組成物は、まず核酸と改変ペプチドとを相互作用させて複合体を形成させ、次いでカチオン性脂質組成物を添加することにより調製される。

1つの実施態様において、ペプチド-核酸複合体または改変ペプチド-核酸複合体を含む組成物が、ペプチド-核酸-脂質凝集体を形成するためにカチオン性脂質と、単独または非カチオン性脂質との組み合わせで混合される。ペプチド-核酸-脂質凝集体は適切な培体中で自発的に形成されるか、または種々の周知の技術もまた、所望の脂質凝集体を産生するために使用され得る口使用されるカチオン性脂質および非カチオン性脂質の相当量は、多くの因子（トランスフェクトされるための細胞型、細胞に対する脂質の毒性および凝集体が使用されるべき環境（例えば、媒体）を含む）に依存する。使用される脂質の種類および量は、細胞毒性を最小にするためにそしてトランスフェクション効率を最大にするために所定の細胞型と釣り合わされる。

別の実施態様において、ペプチド-核酸複合体または改変ペプチド-核酸複合体は、デンドリマー（または、デンドリマーの混合物）と混合されて、ペプチド-核酸-デンドリマー凝集体を形成する。この凝集体は、適切な培地中で自発的に形成される。核酸に対するデンドリマーの相対量は、所定の環境において所定の細胞型でのトランスフェクションを最適にするために調整される。デンドリマーの化学的型、大きさおよび形状もまた、所定の細胞型におけるトランスフェクションを最適にするために選択される。

核酸の送達は、細胞標的化、細胞接着または結合ペプチドまたはタンパク質の使用により増強され得る。RGD配列を含むペプチドが、DNA結合基として作用するポリカチオンスペルミンに結合され得る。RGD-スペルミンペプチドは、細胞標的化、より重要には細胞接着を

介してトランスフェクションを増強させると考えられる。接着タンパク質に対する、およびいくつかの場合においては他の細胞に対する付着は、しばしばインテグリンによって媒介される。細胞外マトリクス中および血液中に存在する多くの接着タンパク質は、細胞認識部位としてトリペプチドアルギニン-グリシン-アスパラギン酸 (RGD) (Ruoslahti, E. および Pierschbacher, D. (1987) Science 238:491) を含む。細菌のような病原体、およびより詳細には、口蹄疫ウイルス (FMDV) (Mason ら、(1994)、Prce. Natl. Acad. Sci. 91, 1932-1936) およびアデノウイルス (Wickham, T. J. ら (1995)、「Targeting of adenovirus penton base to new receptors through replacement of its RGD motif with other receptor-specific peptide motifs」、Gene Therapy 2:750-756) は、表面上に発現した RGD 含有タンパク質を有し、このタンパク質は、宿主細胞上でインテグリンと相互作用してインターナリゼーションを容易にする。RGD、(K) .RGD (特に、ここで u=16) および RGD-スベルミンペプチドは、「LIPOFECTIN」、「LIPOFECTAMINE」、または DOSPER を媒介とするトランスフェクションまたはデンドリマー媒介トランスフェクションを増強させ得る。

ウイルス性ペプチドまたはタンパク質は、様々な周知の技術、例えば、Glushakova, S. E. ら (1985)「Influenza viral glycoprotein isolation using cationic detergent dodecylmethyl ammonium bromide and its subsequent internalization into liposomal membrane」Mol. Genet. Microbiol. Virol. 4:39-44 に記載のようなカチオン性洗剤 DTAB を用いて、単離され得る。あるいは、ウイルス性ペプチドまたはタンパク質、ならびに他の供給源由来の機能性ペプチドまたはタンパク質は、様々な標準的的化学合成方法により生成され得る。例えば、機能性ペプチドは、例えば、Stewart ら (1984) Solid Phase Peptide Synthesis、Pierce Chemical Company、Rockford, Illinois に記載のように自動化固相ペプチド合成を用いて合成され得る。例として挙げた赤血球凝集素ペプチド、K5 および E5 両親水性ペプチド、ならびに G タンパク質を含む、インフルエンザおよび水疱性口内炎ウイルスからの融合誘導ペプチドが、本発明の方法において特に有用である。例として挙げた NLS ペプチドを含む、シミアンウイルス 40 から核局在化シグナルペプチドもまた、好ましい。ペプチドまたはタンパク質は、本発明の方法において、単独でまたは他の機能性ペプチドまたはタンパク質と組み合わせて使用され得る。表 2 に記載されるように 2 つ以上の機能性ペプチド配列 (必要に応じてリンカーまたはスペーサーによって隔てられる) は、所定のペプチドにおいて組み合わせられ得る。

改変ペプチドまたはタンパク質は、様々な周知の結合 (coupling) 技術、例えば、本明細書の実施例に記載のようなヘテロニ機能性剤を用いて調製され得る。スルホスクシンイミジル 4- (p-マレイミドフェニル) ブチレート (スルホ-SMPB)、ジスクシンイミジルスベレート、スクシンイミジル 4- (p-マレイミドフェニル) ブチレート (SMPB)、4- (スクシンイミジルオキシカルボニル- α -メチル- α - (2-ピコジルジチオ) -トルエン (SMPT)、スルホスクシンイミジル 6- [3- (2-ピリジルジチオ) プロピオンアミド] ヘキサノエート (スルホ-LC-SPDP)、スクシンイミジル 6- [3- (2-ピリジルジチオ) プロピオンアミド] ヘキサノエート (LC-SPDP)、N-スクシンイミジル 3- (2-ピリジルジチオ) プロピオネート (SPDP)、スルホスクシンイミジル 4- (N-マレイミドメチル) シクロヘキサン-1-カルボキシレート (スルホ-SMCC)、スクシンイミジル 4- (N-マレイミドメチル) シクロヘキサン-1-カルボキシレート (SMCC) のようなスクシンイミジル架橋剤またはマレイミジル架橋剤; m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスルホスクシンイミドエステル (スルホ-MBS)、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (MBS)、スルホスクシンイミジル (4-ヨードアセチル) アミノベンゾエート (スルホ-SIAB)、N-スクシンイミジル (4-ヨードアセチル) アミノベンゾエート (SIAB) を含むがこれらに限定されない、様々な架橋剤が、当該分野において公知であり広く市販されているペプチドまたはタンパク質とポリアミンとを結合する方法は、当該分野で周知である。代表的な方法は、Staros, J. V. (1982) Biochemistry 21:3990 に開示されている。本明細書中で例示される任意の機能性ペプチドまたはタンパク質、またはそれらの機能性等価物は、核酸結合剤に対しての (例えば、ポリアミンそして好ましくはスベルミンに対しての) 共有結合によ

10

20

30

40

50

て改変され得る。

脂質またはデンドリマーへのペプチドまたはタンパク質の共有結合は、公知の結合 (coupling) 剤および公知の誘導体化方法を使用して、多くの従来の方法によって実施され得る。

トランスフェクションにおいて用いられる媒体は、好ましくは、血清または高塩レベルのような、カチオン性脂質またはデンドリマーに媒体される細胞のトランスフェクションを阻害し得る成分を有するべきではない。

様々なカチオン性脂質が当該分野において公知である。概して、一価または多価のいずれの如何なるカチオン性脂質は、本発明の組成物および方法において用いられ得る。多価カチオン性脂質が概して好ましい。カチオン性脂質は、アミン、アミドまたはそれらの誘導体の飽和および不飽和のアルキルおよび脂環式、エーテルおよびエステルを含む。カチオン性脂質の直鎖および分岐鎖アルキルおよびアルケン基は、1~約25個の炭素原子を含み得る。好ましい直鎖または分岐鎖アルキルまたはアルケン基は、6個以上の炭素原子を有する。脂環式基は、約6~30個の炭素原子を含み得る。好ましい脂環式基は、コレステロールおよび他のステロイド基を含む。カチオン性脂質は、特に、 Cl^- 、 Br^- 、 I^- 、 F^- 、アセテート、トリフルオロアセテート、スルフェート、ニトライト、トリフレート (triflate)、およびニトレートを含む、様々な対イオン (アニオン) を用いて調製され得る。

周知のカチオン性脂質は、N- [1- (2,3-ジオレオイルオキシ) -プロピル] -N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド (DOTMA) である。Felgner, P.L. ら、(1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7417を参照のこと。DOTMAおよび類似のジエステルDOTA (1,2-ビス (オレオイルオキシ) -3,3- (トリメチルアンモニウム) プロパン) は市販されている。DOTMAに構造的に関連する更なるカチオン性脂質は、本明細書中に参考としてその全体を援用する米国特許第4,897,355号に記載されている。

DOTMAおよびDOTAPに関連した、他の有用なカチオン性脂質の群は、通常DORIエテルまたはDORIエステルと称される。DORI脂質は、トリメチルアンモニウム基のメチル基の1つがヒドロキシエチル基と置き換わっている点で、DOTMAおよびDOTAPと異なる。DORI脂質は、ホスホリパーゼAのローゼンターリンヒビター (RI) と類似している (Rosenthal, A.F. および Geyer, R.P., (1960) J. Biol. Chem. 235:2202-2206)。DORI脂質のオレオイル基は、パルミトイル基またはステアロイル (stearoyl) 基のような他のアルキルまたはアルケン基と置き換えられ得る。DORIタイプ脂質のヒドロキシル基は、さらなる機能化 (functionalization)、例えば、エステル化のためおよびノまたはエーテル形成のための部位として使用され得る。

本発明の組成物および方法において用いられ得るさらなるカチオン性脂質には、1991年10月17日に公開された・PCT出願第WO 91/15501号・Pinnaduwege, P. ら (1989)、Biochem. Biophys. Acta. 985:33-37; Rose, J.K. ら (1991)、BioTechniques 10:520-525; Ito, A. ら (1990) Biochem. Intern. 22:235-241に、細胞のトランスフェクションのために有用と記載されるものが含まれる。

ポリリジンとDOPEと結合させることによって形成される多価カチオン性脂質 (Zhou, X. ら、(1991)、Biochem. Biophys. Acta 1065:8-14) および他のリポポリリジンもまた、本発明の方法および組成物において用いられ得る。

カルボキシスベルミンを含有する多価カチオン性脂質もまた、本発明の組成物および方法において有用である。Behr, J-P. ら (1989)、Proc. Natl. Acad. Sci. 86:6982-6986およびEPO公開出願第304111号 (1990) は、5-カルボキシスベルミルグリシンジオクタデシルアミド (DOGS) およびジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン5-カルボキシスベルミルアミド (DPPES) を含むカルボキシスベルミン含有カチオン性脂質を記載している。さらなるカチオン性脂質は、DOGSおよびDPPESのオクタデシル基およびパルミトイル基をそれぞれ、他のアルキル基またはアルケン基で置換することによって得られることができる。DOSPER (特定の式および一般式については式Bを参照のこと) と称される多価カチオン性脂質もまた、本発明の方法において有用である。米国特許第5,334,761号 (これは、その全体が本明細書において参考として援用される) もまた、本発明において有用である

10

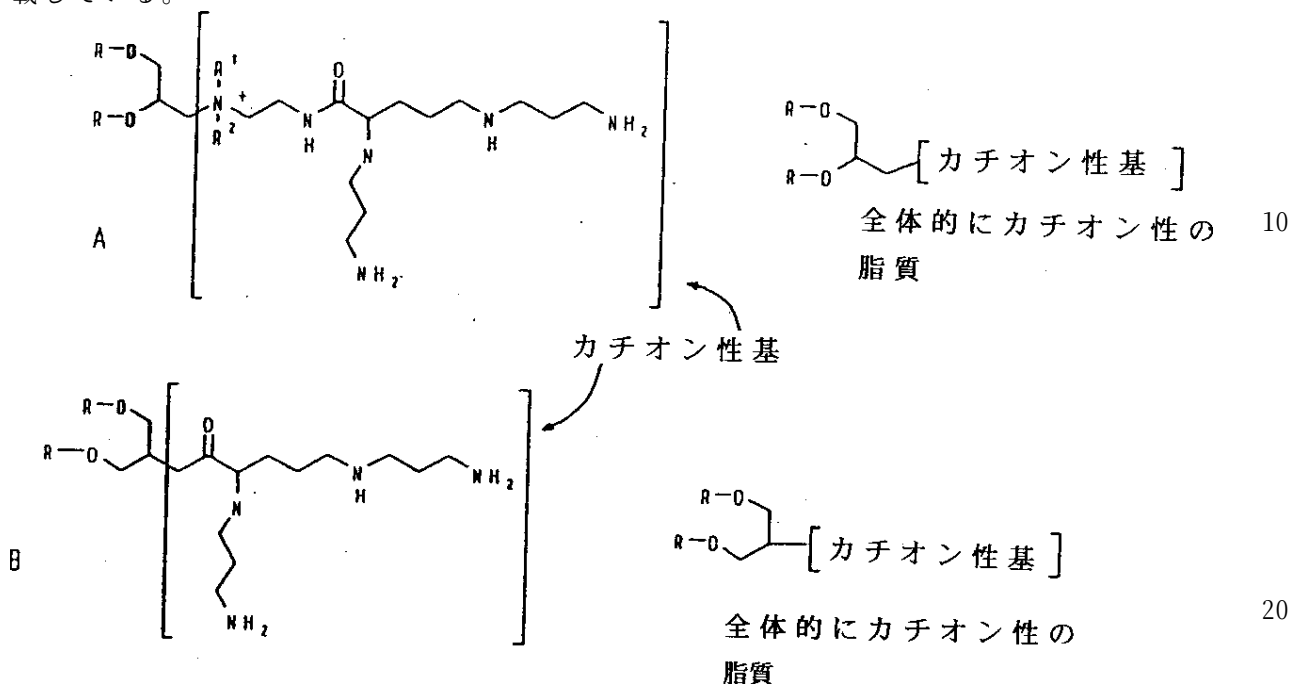
20

30

40

50

DOSPA（特定の式および一般式については式Aを参照のこと）を含むカチオン性脂質を記載している。また、米国特許第5,674,908号（これは、その全体が本明細書において参考として援用される）は、本発明において有用であるTMTPSを含む、ポリカチオン性脂質を記載している。



PCT出願WO 95/17373は、トランスフェクションに有用な、高度にパッキングされた多価カチオン性のアンモニウム、スルホニウム、およびホスホニウム脂質を記載する。これらのカチオン性脂質は、本発明の方法において有用である。

本発明のトランスフェクション組成物において、カチオン性脂質は、非カチオン性脂質、好ましくは中性脂質と必要に応じて組み合わせられ、改変ペプチド核酸複合体に結合する脂質凝集体を形成し得る。本発明において有用な中性脂質には、とりわけ以下が含まれる：レシチン；ホスホチジルエタノールアミン；DOPE（ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン）、DPhPE（ジフィタノイルホスファチジルエタノールアミン）、DPPE（ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン）、ジパルミテオイルホスファチジルエタノールアミン、POPE（パルミトイルオレオイルホスファチジルエタノールアミン）、およびジステアロイルホスファチジルエタノールアミンなどのホスファチジルエタノールアミン；ホスホチジルコリン；DOPC（ジオレオイルホスフィジルコリン）、DPPC（ジパルミトイルホスファチジルコリン）、POPC（パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン）、およびジステアロイルホスファチジルコリンなどのホスファチジルコリン；ホスファチジルグリセロール；DOPG（ジオレオイルホスファチジルグリセロール）、DPPG（ジパルミトイルホスファチジルーグリセロール）、およびジステアロイルホスファチジルグリセロールなどのホスファチジルグリセロール；ホスファチジルセリン；ジオレオイル-ホスファチジルセリンまたはジパルミトイル-ホスファチジルセリンなどのホスファチジルセリン；ジホスファチジルグリセロール；脂肪酸エステル；グリセロールエステル；スフィンゴ脂質；カルドリピン（cardolipin）；セレブロシド；およびセラミド；ならびにそれらの混合物。中性脂質にはまた、コレステロールおよび他の3βOH-ステロールが含まれる。

デンドリマーは、いくつかの、現在十分に検証されている方法によって調製され得る。以下を参照のこと：WO 95/24221；D.A.TomaliaおよびH.D.Durst（1993）、E.Weaver（編）Topics in Current Chemistry, 第165巻：Supramolecular Chemistry I-Directed Synthesis and Molecular Recognition, Springer-Verlag, Berlin, 193-313頁；米国特許第5,527,524号；同第5,338,532号；同第4,694,064号；同第4,568,737号；同第4,507,466号；およびPCT特許出願；WO 8801179；WO 8801178；およびWO9502397。「STARBURST」（登録商標、Dendritech, Inc.）、またはそれらの外表面にカチオン性アミノ酸もしくは他のカチオン性種

を有するものを含むデンススター (dense star) ポリアミドアミン (PAMAM) デンドリマー、あるいは「SUPERFECT」(登録商標、Qiagen, Inc.) または活性化デンドリマーは、本発明のトランスフェクション法に好ましい。デンドリマーを用いる使用のためのトランスフェクションプロトコル、および所定のトランスフェクションのための所定のデンドリマーの選択の議論は、J.F.Kukowska-Latollaら、(1996) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93:4897-4902; A.Bielinskaら、(1996) Nucleic Acids Res.24 (11):2176-2182; W09524221; W09319768; W09502397; そしてJ.HaenslerおよびR.Szoka (1993) Bioconjugate Chem.4:372-379、ならびにM.X.Tangら、(1996) Bioconjugate Chem.7P703-714に示される。

本発明は、特定のペプチドもしくはタンパク質、または改変ペプチドもしくはタンパク質が、核酸での真核生物細胞のトランスフェクションの効率を有意に増強し得るという発見に基づいている。ペプチドもしくはタンパク質または改変ペプチドもしくはタンパク質は、DNAに結合し、そして融合誘導 (fusagenic) ペプチドまたはタンパク質として機能し、細胞内局在化または細胞接着のために機能する。核酸への結合を増強するために必要または所望であれば必要に応じて改変され、インターナリゼーション誘発シグナル (internalization-triggering signal)、またはエンドサイトーシス誘発シグナル、または輸送シグナルとして機能するペプチドまたはタンパク質はまた、本発明のトランスフェクション法において機能する。本発明の組成物および方法は、トランスフェクション試薬を添加する前に核酸と結合した場合にトランスフェクションの効率を有意に向上する、必要に応じて核酸結合基と共有結合的に改変されたペプチドまたはタンパク質を含む。これらの結合された核酸は、細胞および細胞核へより効率的に輸送され、従ってより少ない核酸出発材料を必要とする。カチオン性脂質送達系またはデンドリマー送達系を用いる本発明が例示されるが、融合誘導および細胞内局在化ペプチドおよび細胞標的化ペプチドは、種々の公知の送達系を用いるトランスフェクションを増強するのに効果的である。従って、本発明は、これらのペプチドおよび改変ペプチド (デンドリマーに共有結合的に結合されたペプチド、または脂質に共有結合的に結合されたペプチドを含む) を使用する、以下を含むが、それらに限定されない他の核酸送達手段によるトランスフェクションを増強する改良されたトランスフェクション法を提供する: エレクトロポレーション (T.K.WongおよびE.Neumann (1982)、Biochem.Biophys.Res.Commun.107:584およびE.Neumannら (1982)、EMBO J.1:841)、リン酸カルシウム (F.L.GrahamおよびA.J.Vander Eb (1973)、Virology 52:456)、マイクロインジェクション (M.R.Capecci (1920) 22:479)、DNAでコートされた微小粒子を用いる弾道形質転換 (ballistic transformation) (D.T.Tomesら (1990)、Plant Mol.Biol.Manual A13:1-22およびG.N.Yeら (1990)、Plant.Molec.Biol.15:809)、DEAE-デキストラン (A.VaheriおよびJ.S.Pagano (1965)、Science 175:434)、ならびにポリブレン-DMSO (S.KawaiおよびM.Nishizawa (1984)、Molec.Cell.Biol.4:1172)。

本発明のトランスフェクション組成物には、核局在化配列、融合誘導ペプチドもしくは輸送ペプチド、またはポリカチオンに共有結合的に結合されたレセプターリガンドペプチドもしくは輸送ペプチド配列を含むペプチドまたはタンパク質を用いて、真核生物細胞をトランスフェクトするための組成物が含まれる。核局在化配列、融合誘導ペプチド、ポリカチオンに結合された輸送ペプチドまたはレセプターリガンドシグナルを有するペプチドまたはタンパク質もまた、本発明の一部である。好ましいリンカーには、例えば、ヘテロ二機能性 (heterobifunctional) 架橋剤が含まれる。ポリカチオンは、好ましくは、ポリアミン、そして最も好ましくはスベルミンである。先に記載したように、本発明のトランスフェクション組成物およびペプチドは、以下を含むが、それらに限定されない広範な種々の送達系に関して有用である: エレクトロポレーション、リン酸カルシウム、マイクロインジェクション、弾道形質転換、DEAE-デキストラン、およびポリブレン-DMSO。従って、本発明は、核酸で真核生物細胞をトランスフェクトする方法を含み、この方法は、(1) ペプチドもしくはタンパク質または改変ペプチドもしくはタンパク質を核酸と混合し、ペプチド-核酸複合体を形成する工程; および (2) 工程 (1) で得たペプチド-核酸複合体を、公知の送達手段を用いて細胞に導入する工程を一般に包含する。あるいは、本発

10

20

30

40

50

明の方法は、(1) トランスフェクション剤を核酸と混合する工程；および(2) 必要に応じて核酸結合基に共有結合的に結合したペプチドまたはタンパク質を導入する工程を包含し得る。さらに、両方の方法は、任意の数のタンパク質またはペプチドを用いて組み合わせられ得る。当業者は、本開示を含む、当該分野に一般的に利用可能な知識に基づいて、過度な実験を要することなく、任意の送達系によって、本発明の組成物およびペプチドまたはタンパク質を使用し得る。

本発明は、薬学的組成物、治療用組成物、および診断用組成物を含む。それぞれの場合において、これらの組成物は、選択された核酸の、標的細胞または標的組織への導入をもたらすのに十分な本発明のトランスフェクション組成物の量を含む。本発明の薬学的組成物および治療用組成物は、適切な薬学的キャリアを含む。これらの薬学的組成物または治療用組成物における任意のカチオン性または多価カチオン性種は、薬学的に適切な対イオンを有する塩として提供され得る。

本発明のトランスフェクション組成物の成分を含むキットは、トランスフェクション組成物の調製および使用を容易にするために使用され得る。そのようなキットは、研究目的のために行われる真核生物細胞の任意のトランスフェクションのための研究試薬として、提供および使用され得る。そのようなキットはまた、診断的適用および治療的適用のために使用され得る。キットは、単一のトランスフェクションまたは複数のトランスフェクションにおける使用に十分な成分とともに設計され得る。1つの実施態様において、キット成分は、カチオン性脂質組成物、およびペプチドもしくはタンパク質または改変ペプチドもしくはタンパク質を含み、トランスフェクションを増強させる。カチオン性脂質組成物は、カチオン性脂質および好ましくは中性脂質を含む。好ましいカチオン性脂質組成物は、一価カチオン性または多価カチオン性脂質を含む。より好ましいカチオン性脂質組成物は、一価カチオン性脂質DOTMAおよびDOTAP、多価カチオン性脂質DOSPA、またはDOSPAのアナログおよびホモログ(DOSPERを含む)を含む。好ましい中性脂質は、DOPEまたはDPHPE、およびそのアナログまたはホモログを含む。

所定のペプチドもしくはタンパク質または改変ペプチドもしくはタンパク質によってもたらされるトランスフェクション増強のレベルは、因子の中でもとりわけ、細胞型、トランスフェクション剤の成分、使用されるトランスフェクション法、トランスフェクション組成物に対する成分の添加の順番、またはトランスフェクション組成物における成分の複合体化の順番に依存して変化し得る。当業者は、本明細書中に提供される案内および方法を使用し、当該分野において周知のトランスフェクションのための手順、アッセイ、および方法の知識を用いて、所定の系におけるトランスフェクションの増強のための本発明の特定のペプチドもしくはタンパク質または改変ペプチドもしくはタンパク質を、過度な実験なしに選択し得る。

当業者には、最適なトランスフェクションのために、多くのパラメータが重要であることが容易に理解される。カチオン性脂質媒介トランスフェクションについて、これらのパラメータには、カチオン性脂質濃度、カチオン性および非カチオン性脂質の相対量、核酸の濃度、トランスフェクションに使用する媒体、細胞がトランスフェクション組成物とともにインキュベートされる時間の長さ、使用するペプチドの量、使用するDNA結合基またはポリアミンの量、ならびにトランスフェクション組成物の成分を組み合わせる方法(例えば、順番)が含まれる。デンドリマー媒介トランスフェクションについて、これらのパラメーターは、デンドリマーのサイズ、形状、および化学的組成、デンドリマーと核酸の相対的な量、他のトランスフェクション剤(DEAE-デキストラン、クロロキン)の添加、核酸の濃度、トランスフェクションに使用される媒体、細胞がトランスフェクション組成物とともにインキュベートされる時間の長さ、使用されるペプチドの量、使用されるDNA結合基またはポリアミンの量、およびトランスフェクション組成物の成分を組み合わせる方法(例えば、順番)が含まれる。トランスフェクトされるべき各細胞型について(各種類のトランスフェクション系について)のこれらのパラメーターを最適化することが、必要であり得る。本明細書中に提供される案内、および本明細書中に実施例において記載されるようなトランスフェクションアッセイを使用するそのような最適化は、日常的である。

本発明のトランスフェクション組成物を作製、および本発明のトランスフェクション法を実施するために、本明細書中に特に詳細に記載されているもの以外の代替の方法、試薬、手順、および技術が、使用され得るか、または容易に適合され得ることも当業者には明らかである。そのような代替の方法、試薬、手順、および技術は、本発明の精神および範囲内にある。

本発明のトランスフェクション組成物および方法を、以下の限定することのない実施例においてさらに説明する。本明細書中で使用する全ての略語は、当該分野において標準的な略語である。実施例において詳細に記載されていない特定の手順は、当該分野において周知である。

本明細書において参照する全ての刊行物および特許は、それらの全体が参考として特に援用される。

10

実施例

実施例 1：ペプチドおよびペプチド結合体

ペプチドを、例えば、Stewartら（1984）、Solid Phase Peptide Synthesis、Pierce Chemical Company、Rockford、Illinoisに記載のように、自動化固相ペプチド合成を使用して合成した。ペプチドを、ポリアミド-珪藻土（kieselguhr）複合体樹脂およびMilliGen 9050ペプチド合成機（Milligen/Biosearch、Burlington、MA）を用いて合成した。結合サイクル（coupling cycles）を、製造業者の推奨に従って行った。9-フルオレニル-メチルオキシ-カルボニル（Fmoc）アミノ酸を、ペンタフルオロフェニルエステル（-OPfpエステル）として活性化し；ペプチドを、 α -アミノ基について、（1）N,N-ジメチルホルムアミド（DMF）中の20%ピペリジンを用いて脱保護し；ペプチドを、樹脂から切断し、95%トリフルオロ酢酸（TFA）、（2）試薬 R [TFA（90%）、チオアニソール（thioanisol）（5%）、エチレンジチオール（3%）、およびアニソール（2%）]、試薬 B [TFA（88%）、フェノール（5%）、トリイソプロピルシラン（2%）、および水（5%）]、または試薬 T [TFA（95%）、トリイソプロピルシラン（5%）]を用いて脱保護し；脱保護剤は、使用される保護基、およびペプチド中のアミノ酸残基の型に基づいて、当該分野において理解されるように選択され；粗製ペプチド（crude peptide）を沈殿させ、そしてエーテルで洗浄した。ペプチドを、Waters HPLC系を用いて、Vydac C-18逆相カラムで高速液体クロマトグラフィーにより精製した。移動相は、0.01%TFA含有95%水/アセトニトリルから、0.01%TFA含有25%水/アセトニトリルの勾配からなった。ペプチドを、HPLC、アミノ酸分析、および質量分析法（ESまたはMALDI-TOF）によって特徴付けした。本発明において有用な例示的なペプチド配列を、表1～3に列挙する。

20

30

部分的にのみ脱保護した（すなわち、少なくとも1つのアミノ酸保護基を取り除かない）特定のペプチドが、トランスフェクションの有意な増強を示すことを見出した。脱保護剤の適切な選択は、所望の脱保護基を保持するペプチドの選択的合成を可能にする。例えば、試薬 T での脱保護は、R 残基上に残存するMtr基を有する部分的に脱保護されたペプチドの合成を可能にする、アルギニン上のMtr保護基を除去しない。

ポリアミン結合ペプチドの合成

ペプチドは、自動化ペプチド合成機を用いて、ポリアミン（例えば、スベルミン）で改変され得る。FmocまたはBoc化学物質のいずれかが使用され得る。例えば、スベルミンは、スキーム I に例示されるように、ペプチドのN末端に結合され得る。5-カルボキシスベルミンおよびBoc保護5-カルボキシスベルミンは、Behr, J.P. ら（1989）Proc. Natl. Acad. Sci., 86: 6982-6986において記載されるように合成され得る。Fmoc-カルボキシスベルミンは、9-フルオレニルメチルクロロホルメートでカルボキシスベルミンを処理することによって合成され得る。Fmoc-カルボキシスベルミンまたはペンタフルオロフェニルエステルは、スベルミン改変ペプチドを得るために、合成機において使用され得る。1つより多いポリアミンは、この様式で、保護基の適切な組み合わせを用いて所定のペプチドに結合され得る。

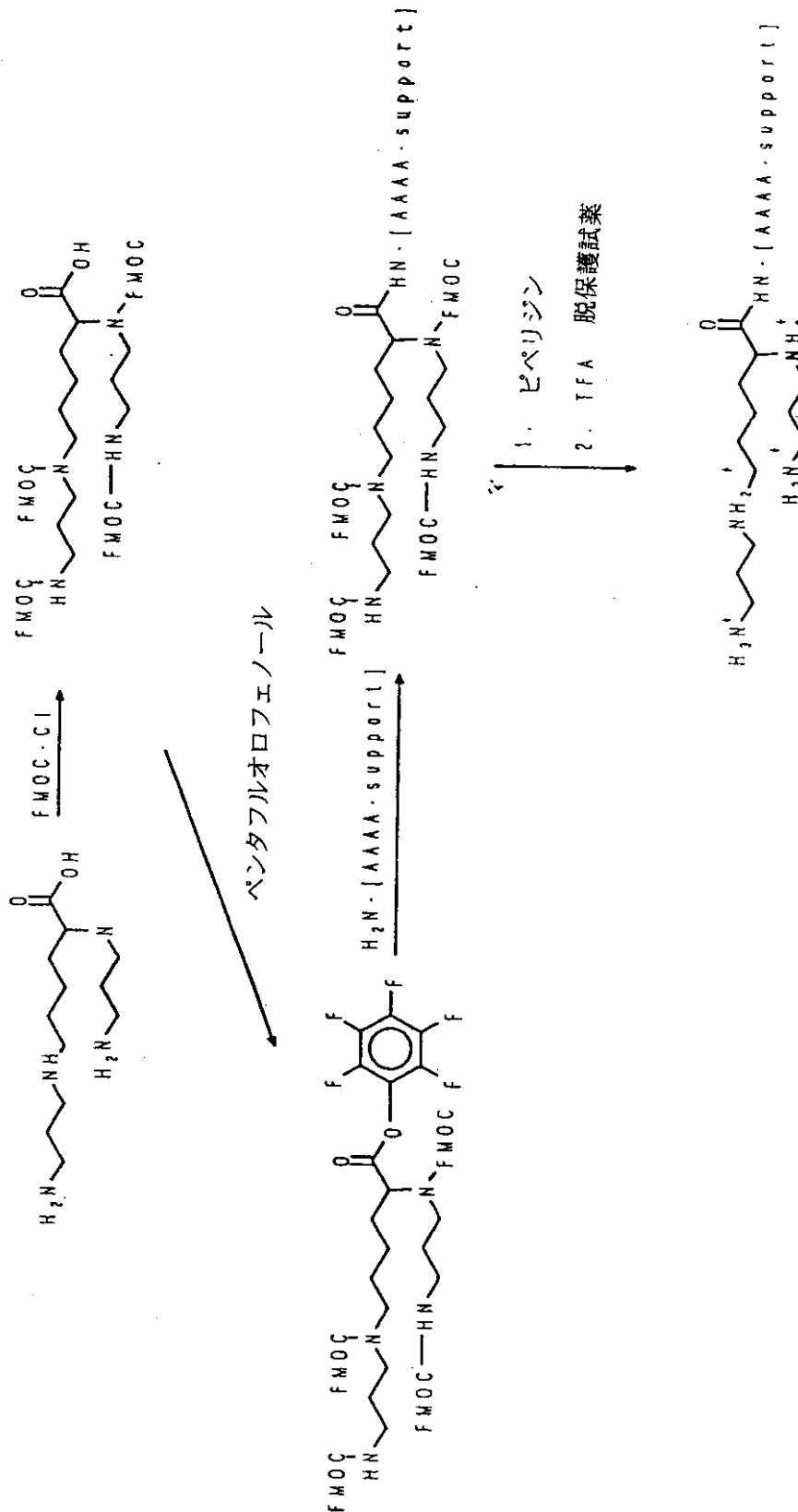
40

$N^I, N^{II}, N^{III}, N^{IV}$ -テトラ（9-フルオレニルメトキシカルボニル）-5-カルボキシスベルミン（Fmoc-カルボキシスベルミン）

50

5-カルボキシスペルミン (11.0 g) を、100mlの水中に溶解した。溶液を氷上で冷却し、そして200mlジオキサンで希釈し、そしてアルゴンでフラッシュした。200mlジオキサン中、50 gの9-フルオレニルメチルクロロホルメート (Fmoc-Cl) の溶液を、冷却したカルボキシスペルミンに徐々に添加した。反応混合物を、アルゴン下4 °Cにて1時間、アルゴン下室温にて一晩攪拌した。反応を、TLC (シリカゲル、CHCl₃/MeOH : : 9/1) によってモニタリングした。反応混合物を、1.5L氷冷水中に注ぎ、そして酢酸エチル (2 L) で抽出した。有機層を分離し、400mlの1 N HCl (2 ×) および300mlの飽和NaClで順番に抽出した。有機層をNa₂SO₄で乾燥させ、そしてロータリーエバポレーターで濃縮した。得られる粘着性の物質を、フラッシュクロマトグラフィー (シリカ、CHCl₃/MeOH : : 95/5) に供し、25.5 gの所望の物質を白色の柔らかい固体として得た。

スキーム 1



Fmoc-カルボキシ-スベルミン-OPfpエステル

3ml ジオキサン溶液中のペンタフルオロフェノール (4.2g) 溶液、続いて 2 ml ジオキサンを、10ml ジオキサン中の Fmoc-カルボキシ-スベルミン (8.0g) 溶液に添加した。その結果得られた混合液を、氷水浴にて冷却しアルゴンでフラッシュした。4ml ジオキサン中の新たに蒸留したジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC, 1.6g) を冷却した反応混合液に添加

10

20

30

40

50

した。その混合液を、アルゴン存在下で、約1時間4℃にて攪拌し、そして室温で一晩攪拌した。沈殿したジシクロヘキシル尿素(DCU)を反応混合液から濾過し、次いでこれをロータリーエバポレーターにて乾燥まで濃縮させた。残留物を一晩、高減圧下で乾燥させた。このエステルは、少し黄色がかったゴムとして定量的な収率で得られ、これをペプチド合成機にてさらに精製することなく使用した。

スベルミン改変ペプチドの合成

スベルミン改変ペプチドを、製造者によって示唆されたプロトコルを使用してMilligen9050合成機でFmoc化学を用いて合成した。スキーム1に図示するように、ペプチドを慣習的に合成し、カルボキシスベルミンを、合成機上で付加される最後のアミノ酸としてFmoc-カルボキシスベルミン-OPfpエステルを使用して、合成されたペプチドのN末端に付着させた。使用した脱保護試薬を、上述のように選択した。ペプチド-スベルミン結合体を使用するまで冷凍保存した。表4は、Fmoc-カルボキシ-スベルミンを使用して合成したスベルミン結合ペプチドのいくつかの例を列挙する。改変されたペプチドをVydac C-18カラムでHPLCを使用して分析および精製した。改変されたペプチドを、HPLC、アミノ酸分析および質量分光測定(ESもしくはMALDI-TOF)によって特徴づけた。この方法は、ポリアミン-ペプチド結合体の合成のために、周知技術を考慮して使用され得るか、または容易に適合させられ得る。

ペプチド-スベルミン結合体はまた、スキーム2に図示するようにヘテロ二機能性基架橋剤であるスルホ-SMPB(Pierce Chemical Co., Rockford, IL)を使用して、調製され得る。

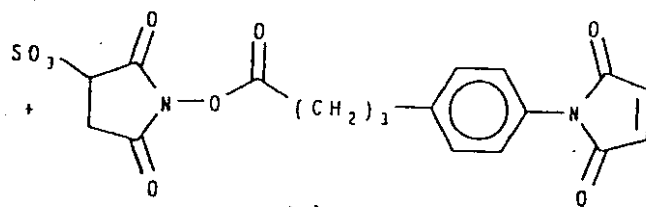
(S.S.Wong「Heterobifunctional Cross-linkers」Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking CRC Press 147~194頁を参照のこと)。手短に言えば、DMF中の100mg/mlスルホ-SMPBを、50mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.5)を使用して、20mg/mlに希釈する。次いでスベルミン(50mMリン酸ナトリウム緩衝液中に50mg/ml)を、スルホ-SMPB溶液に対して3:1のモル比で添加した。室温で1時間後、反応混合物を、リン酸ナトリウム緩衝液を使用して(LH-20カラム)分取する。最初の主なピーク(スベルミン-MPB)を収集した。スベルミン-MPBを、純粋な粉末形態またはアセトニトリル/水溶液のいずれかで末端システイン(HS-)を有する合成(もしくは天然に存在する)ペプチドと1:1.5から1:2の比で混合する。過剰なペプチドを、LH-20カラムで水で溶出させて分離させる。ペプチド-スベルミン結合体は、使用まで冷凍保存する。HS-ペプチドとのスベルミン-MPBの反応は、ペプチドダイマー形成を避けるために、適当な還元条件下で実施すべきである。この方法は、ポリアミン-ペプチド結合体の合成のために、周知技術を考慮して、利用され得るか、または容易に適合させられ得る。

システイン残基を含むペプチドのペプチドダイマーは、所望であれば2つのペプチドの間にジスルフィド結合を形成するために酸化的結合反応によって形成され得る。本発明の鎖状体および混合鎖状体は、自動ペプチド合成によって調製され得、そして所望であれば鎖状体、混合鎖状体、およびペプチドオリゴマー(ダイマーなど)は、本明細書中に記載した方法によって核酸結合基に結合体化され得る。

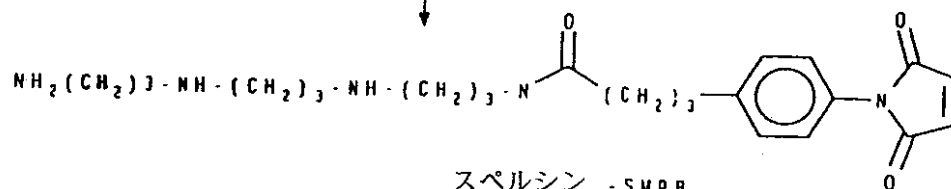
スキーム3は、ペプチドのカルボキシ末端のポリアミンを導入するために自動ペプチド合成機において使用され得、適切に保護されたポリアミン種を図示する(例えば構造II、カルボキシスベルミン結合体化に関して)。そのスキームは、構造IIのカルボキシスベルミン誘導体の合成を図示しており、これは、任意の類似のポリアミン誘導体の合成について容易に一般化され得る。ペンタフルオロフェノール基を除去することによって活性化された構造IIの化合物は、ペプチドカルボキシ末端にカルボキシスベルミン基を提供するために固体支持体に結合体化され得る。標準的な自動ペプチド合成を、構造Iの支持体を用いて実施する。構造IIの完全保護カルボキシスベルミンは、それ自身、合成ペプチド鎖に沿って任意の位置でのカルボキシスベルミン基の付加のための試薬として利用され得る。これらの方法は、任意のポリアミンの結合体のために容易にかつ日常的に適合させられ得る。

スキーム 2

スベルシン

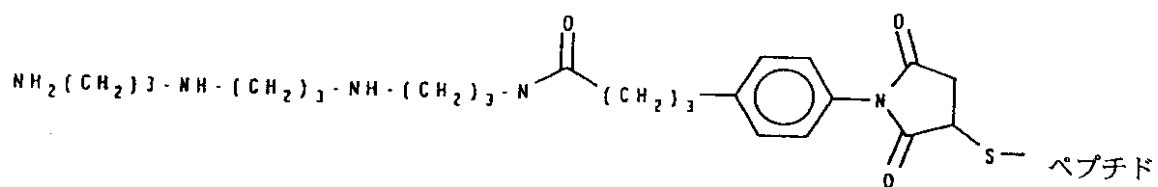


スルホ・SMPB



スベルシン - SMPB

HS - ペプチド

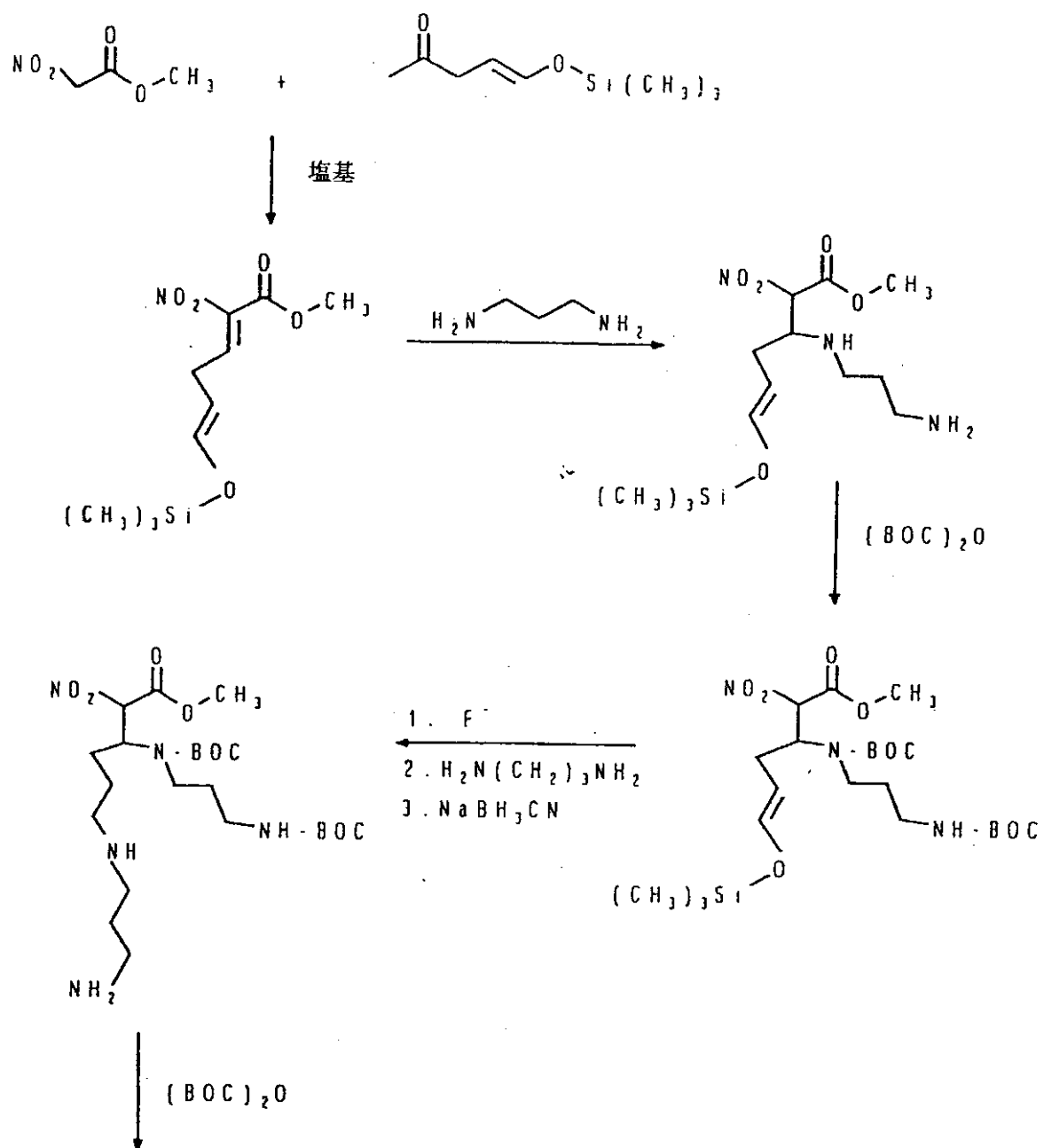


ペプチド

10

20

スキーム 3

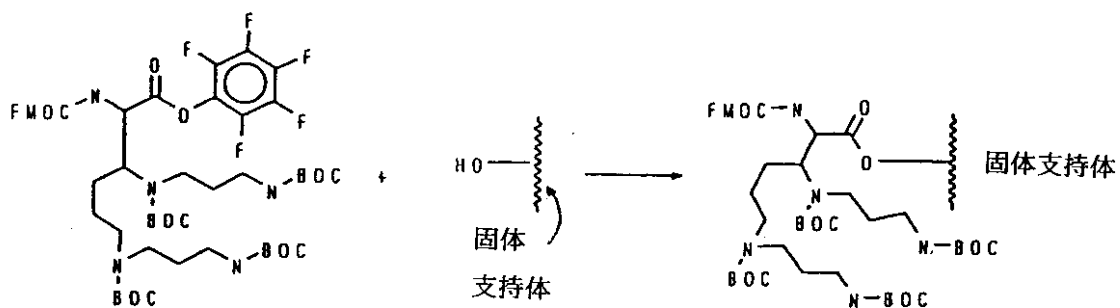
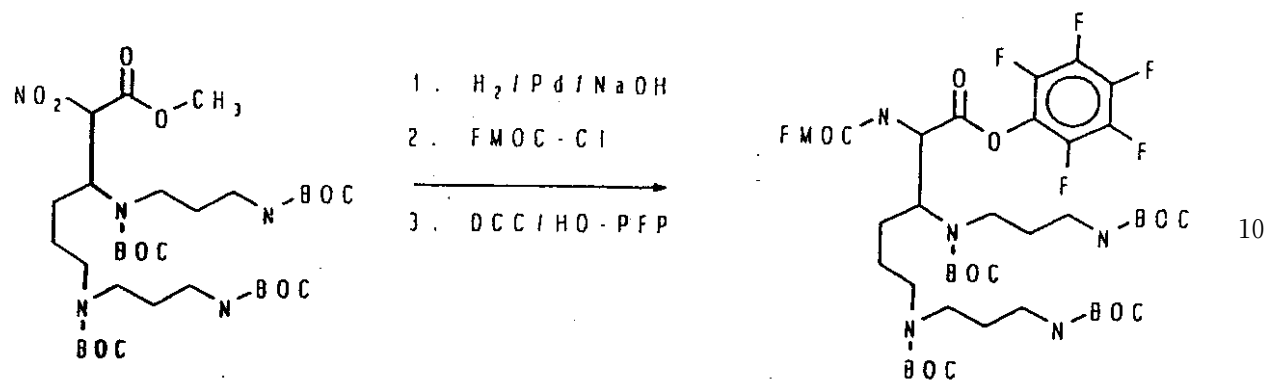


10

20

30

スキーム 3 (続き)



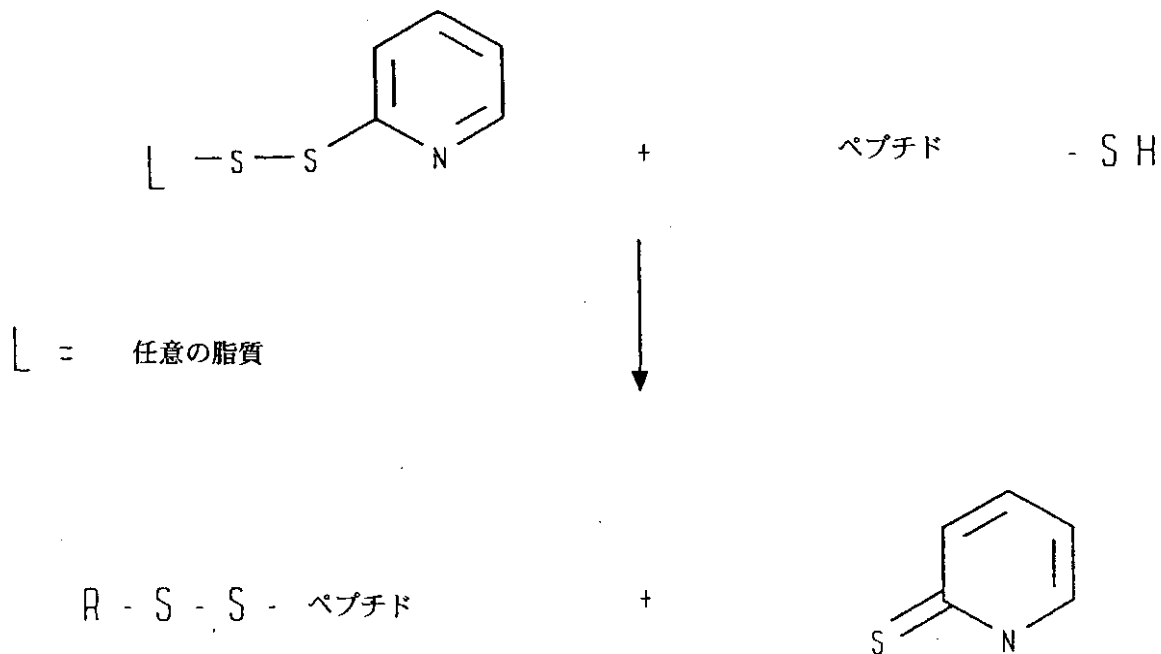
ペプチド-脂質結合体

ペプチド-脂質結合体は、以下のように調製する：反応性頭基（例えば1,2-ジオレオイル-S,N-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート]（N-PDP-PE,Avanti Polar Lipids,Inc.Alabaster,AL）のような基）を有する脂質を、システイン-ペプチド（例えば、機能性ペプチドのいずれかの末端のシステイン）と反応させる。反応は室温で実施され得、次いで放出発色団を測定し得る。スキーム4参照。例えばN-PDP-PEを、メタノール中に溶解させて0.2Mの濃度にする（約200mg/ml）。VSVG-Cys（例えばKFTIVFC）；RGD-Cys（例えばGRGDSPC）；またはCys-NLS（例えばCGWGPKKRKVG）を含有するCys-ペプチドを、適当な溶媒（例えばDMF）に溶解させて100mg/mlの濃度にし、そして1.5-2：1のモル比で、N-PDP-PE溶液と混合した。ペプチド-脂質結合体は、アセトニトリル／水／TFAおよびメタノール溶媒系と共にVydac蛋白およびペプチドC18逆相カラムを使用して、HPLCで精製し得る。その結合体は、UVおよびMS分析によって特徴づけられ得る。

30

40

スキーム 4



10

実施例 2：トランスフェクション培地に添加したウイルス性ペプチドでのヒト線維芽細胞

20

のカチオン性脂質トランスフェクションの増強

以下のウイルス性ペプチドを、実施例 1 に記載のように自動固相ペプチド合成を使用して合成した：インフルエンザウイルスの膜融合領域 (HApep) (Epandら (1992) Biopolymer s 32: 309を参照のこと)；赤血球凝集素ペプチド E5 および K5 を得るための FluHa の改変 (Kamata, H. ら (1994) Nucleic Acids Res. 22: 536-537を参照のこと)；および小胞口内炎ウイルス G-蛋白である VSVG (Schlegel, R. および Wade, M. (1985) J. Virol. 53: 319を参照のこと)。SV40 ラージ T 抗原の核局在化シグナル (NLS)、NLS (Lanford ら (1986) Cell 46: 575を参照のこと) および RGD ペプチド (Ruoslahti, E. および Pierschbacher, D. (1987) Science 238: 491) もまた合成した。合成したペプチドの配列を、表 5 に示す。

新生児ヒト線維芽細胞 (NHF) を、新生児の包皮真皮から単離し、Hawley-Nelson, P., ら (1993) Focus 15: 73 (本明細書中に参考のために援用される) に記載のように調製し、そして最高 20 継代培養した。接着細胞の培養物を 0.1mM MEM、非必須アミノ酸 (NEAA)、10 % (V/V) ウシ胎児血清 (FBS)、100U/mL ペニシリン (PEN) および 100 μg/mL ストレプトマイシン (STREP) を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) で増殖した。培養物を 0.2 5 % (v/v) トリプシン、0.1mM EDTA を用いてコンフルエンスに継代した。

30

プラスミドベクター pCMV β gal および pCMVSPORT β gal は、サイトメガロウイルス プロモーターの制御下に大腸菌 β-ガラクトシダーゼ (β-gal) 遺伝子を含む市販の哺乳類レポーターベクターである (それぞれ Clontech, CA および GIBCO-BRL)。MacGregor ら (1989) Nucleic Acids Res. 17: 2365；Norton ら (1985) Mol. and Cell Biol. 5: 281；Alam (1990) Anal. Biochem. 188: 245 を参照のこと。プラスミド DNA を、標準塩化セシウム法にて精製した。

40

ヒトの線維芽細胞を、トランスフェクションの前日に 24 ウェル皿に 1 ウェル毎に 8×10^4 個でプレートした。トランスフェクション前に、その細胞を無血清 DMEM 溶液でリンスした。一方が「LIPOFECTAMINE」を 3 μg 含有し、もう一方は 0.2 μg の pCMV β gal DNA を含んだ「OPTI-MEM」-I 培地の 2 つの 25 μl アリコート、室温で 30 分間複合体を生成するために合わせた。「LIPOFECTAMINE」(Gibco/BRL: Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) は、多価カチオン性脂質である 2, 3-ジオレイルオキシ-N-[2 (スベルミンカルボキサミド) エチル]-N, N-ジメチル-1-プロパナミニウム トリフルオロアセテート (DOSPA) と DOPE との 3:1 (W/W) の混合物である。ペプチドは、最終濃度 $250 \times$ ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した (表 5 参照のこと)。ペプチド溶液 (1 μl) は、無血清 DMEM トランスフ

50

エクシオン培地250 μ lに添加し、そして、リンスした細胞に添加した。E5, K5, HApep, およびVSVG単独を含む処理、ならびにE5+K5およびVSVG+K5を互いに組み合わせた処置を、全くペプチドを含まない(「LIPOFECTAMINE」とDNAのみ)トランスフェクションサンプルと比較した。2つのペプチドを組み合わせた処置のために、E5、K5、およびVSVGを、全て5 μ Mの濃度で使用した。次いで「OPTI-MEM」-IにおけるDNA-脂質凝集体を、細胞上に添加したペプチドを有するトランスフェクション培地に添加した。37°Cで24時間培養後、細胞を採取、抽出し、上記に記載したように β -ガラクトシダーゼ活性についてアッセイした。

溶解細胞抽出液の酵素活性を、異なる処置プロトコルから得られる発現レベルを比較するために使用した。トランスフェクションの1~2日後、細胞を、PBSで1回リンスし、0.1%の「TRITON」X-100 (t-オクチルフェノキシポリエトキシエタノール; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO; 「TRITON」は、Union Carbide, Inc.の登録商標です。)と0.1Mトリス pH 8.0を1ウェルにつき0.15mlとし、マイナス70°Cで凍結した。37°Cで急速解凍後、溶解物を遠心分離によって清澄化した。溶解細胞抽出物を、本質的にSambrookら(1989) Molecular Cloning A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 16.66頁に記載したような方法で、 β -ガラクトシダーゼ活性についてアッセイした。手短に言えば、2~6 μ gのタンパク質を含む可溶性細胞抽出物を、96ウェルマイクロタイタープレートに1mM $MgCl_2$ 、50mM β -メルカプトエタノールおよび0.88mg/mL o-ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド (galactopyranoside) (ONPG) を含有する100 μ lの0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.5)に添加した。プレート上に10~70ngの β -ガラクトシダーゼ (Gibco/BRL: Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) 標準曲線を含んだ。37°C 5~20分で黄色を発色した。必要であれば150 μ lの1M Na_3CO_3 の添加によって反応を停止させた; OD₄₂₀を、マイクロタイタープレートリーダーで測定した。

図1は、脂質をDNAと複合体化した後にDMEMトランスフェクション培地に添加したペプチドの影響を示す。図1に示すとおり、HApep、およびVSVGとE5との組み合わせを除いてコントロールと比較したトランスフェクションの比較的微量な増強が観察された。VSVG+E5組み合わせは、「LIPOFECTAMINE」のみと比較して2倍より大きい増強を示した。最適なトランスフェクションを生じたペプチド濃度を、表5に載せる。構成成分の添加の順序がペプチドによるトランスフェクションの増強に対する重要な影響を有することが、後にわかった。一般的にカチオン性脂質組成物にDNAを接触させる前の核酸とペプチドの最初の複合体化は、顕著により高いトランスフェクション増強を示した。

実施例3: 「LIPOFECTAMINE」と組み合わせたDNAとプレ複合体化したSp-NLSNLSのトランスフェクション増強

Sp-NLSNLS (スペルミン-5-CO-NH-CH₂-CO-GYGPKKKRKVGGGGYGPKKKRKVG) は、ペプチドが「LIPOFECTAMINE」の添加に先だってDNAとプレ複合体化するとき、ヒト線維芽細胞、NIH3T3、MDCK、およびBHK-21細胞において「LIPOFECTAMINE」と組み合わせてトランスフェクション効率を増強する。

本実施例において、全ての培地、血清、および試薬は、他に記載されていなければ、GIBCO BRL由来であった。全ての細胞を、0.1mM非必須アミノ酸 (NEAA), 100U/mLペニシリン、100 μ g/mLストレプトマイシンを含むダルベッコMEM (DMEM, 高グルコース: 4,500mg/L D-グルコース、L-グルタミンおよびフェノールレッドを含む) で培養した。ヒト線維芽細胞、MDCK、およびBHK-21細胞を、10%ウシ胎児血清 (FBS) と共に培養した。NIH 3T3細胞を、10%仔ウシ血清と共に培養した。ヒト線維芽細胞を、実施例2に記載のように得た。NIH 3T3 (NIH Swissマウス胚、接触阻害した線維芽細胞)、MDCK (イヌ腎細胞)、ベイビーハムスター腎 (BHK-21) 細胞を、アメリカンタイプカルチャーコレクション (Rockville, MD) により得た。全ての培養物を、5%CO₂下37°Cで維持した。1ウェルにつき6 $\times$ 10⁴個のヒト線維芽細胞、4 $\times$ 10⁴個のBHK-21細胞、6 $\times$ 10⁴個のMDCK細胞、および5 $\times$ 10⁴個のNIH 3T3細胞を、24ウェルプレートにトランスフェクション前日にプレートした。トランスフェクションの日には、培養細胞は、50~80%コンフルエントであった。

24ウェルプレートの各ウェルについて、0.5~4 μ Lの「LIPOFECTAMINE」試薬と0.1~0.8 μ

10

20

30

40

50

g pCMV・SPORT- β -galもしくはpCMV β DNA (G.R.McGregorおよびC.T.Caskey (1989) Nucl eic Acids Res.17:2365) とを、無血清培地 (0.1mM NEAAを添加した”OPTIMEM-IもしくはD-MEM) の別個の25 μ Lアリコートに希釈した。Sp-NLSNLS (1-4 μ g、1mg/ml水溶液とする) を、DNA溶液に添加し、プレ複合体化を許容するために15分間室温でインキュベートした。DNA-Sp-NLSNLS溶液を、希釈「LIPOFECTAMINE」と共に混合し、次いで室温で30分間インキュベートした。細胞は、NEAAを有する無血清DMEMでリンスし、次いで各ウェルあたり0.2mlのNEAAを有する無血清DMEMを細胞に加えた。DNA-Sp-NLSNLS-脂質複合体を、細胞上の無血清D-MEMに添加し、5時間37°Cでインキュベートし、次いでFBS (最終濃度10%) を含むD-MEMの1mlを添加した。培養物を24時間インキュベートし、次いで固定し、X-galでインサイチュで染色する (J.R.Sanesら (1986) EMBO J.5:3133,以下参照) かもしくは

10

ONPGアッセイ (実施例2に記載したように) のために採取した。
トランスフェクション効率の増強を試験するために、ヒト線維芽細胞を、「LIPOFECTAMINE」およびSp-NLSNLSを使用して、pCMV・SPORT- β -gal DNAでトランスフェクションした。Sp-NLSNLSの濃度の増加を試験し、 β -ガラクトシダーゼ活性をONPGでアッセイした (図2) 。トランスフェクションにおいて、増強活性がプラトーになるのは、2~20 μ gのSp-NLSNLSが0.4 μ g DNAと予め複合体を形成した時である。同様の実験において、5倍から8倍間の増強レベルが、0.4 μ g DNAごとに2~4 μ gのSp-NLSNLSで日常的に観察された (データは示さない) 。

同様にトランスフェクションしたヒト線維芽細胞を、X-galでインサイチュで染色した。Sp-NLSNLS (2 μ g) とDNA (0.4 μ g) を含む脂質 (2 μ L) の、最高活性濃度の結果を撮影し、陽性細胞をカウントした。陽性細胞のパーセント (3定量の平均 $\pm$ ハーフレンジ) を決定した: 「LIPOFECTAMINE」 (4 $\pm$ 2%)、Sp-NLSNLSを有する「LIPOFECTAMINE」 (18 $\pm$ 6%) 。これは、トランスフェクション細胞のパーセントにおける4倍の増強である。

20

インサイチュ染色を、 β -ガラクトシダーゼ発現を立証するために使用した。細胞をPBSでリンスし、2% (v/v) ホルムアルデヒド、PBS中の0.2%グルタルアルデヒドで5分間固定し、PBSで2度リンスし、0.1% X-gal (Gibco/BRL: Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD)、5mMフェロシアン化カリウム、5mMフェリシアン化カリウム、PBS中の2mM MgCl₂で、一晚染色した。リンスした細胞を、ホフマン光学を伴うNikon倒立顕微鏡の10倍の対物レンズを用いて撮影した。トランスフェクション効率を、 β -gal陽性 (青に染まった) 細胞数をカウントするかまたは概算することによって評価した。

30

Sp-NLSNLSによるトランスフェクション増強の分析を、広範囲の脂質およびDNA濃度を使用して、ヒト線維芽細胞、BHK-21、NIH3T3、およびMDCK細胞で行った。データを、図3A-3Hに示す。それぞれの場合において、ただ脂質およびDNAの至適濃度における活性だけではなく、活性のプラットフォーム全体が上昇される。このタイプの増強は、トランスフェクションの高い効率の再現性を容易にし、多価カチオン性脂質媒介トランスフェクション (特に「LIPOFECTAMINE」を用いるトランスフェクション) の活性スペクトルを広げ、より広い範囲のDNAおよび脂質濃度にわたって高い活性を生じる。トランスフェクションにおけるSp-NLSNLSのようなスベルミン誘導体化ペプチドの使用は、所定の系において高活性カチオン性脂質トランスフェクションを達成するのに以前必要とされた脂質およびDNA濃度の細かな至適化の量を減少させる。

40

Sp-NLSNLSおよび他のペプチドおよびスベルミン誘導体化ペプチドを有する脂質およびDNA濃度の範囲を超えて活性のプラットフォームを増加させることによって、等価もしくはより高い効率のトランスフェクションからより高い細胞収率を生じる、より低い量の脂質およびDNAで高いレベルのトランスフェクションを達成することが可能である。

表6は、図3Aおよび3Bに図示した実験において生じたデータを使用して、この観察を図解している。0.07ng β -gal/ μ gタンパク質のピーク活性は、0.4 μ g DNAおよび2 μ L「LIPOFECTAMINE」の「LIPOFECTAMINE」単独で達成される。これらの条件に対するタンパク質収量 (細胞収量に直接的に比例する) は、67.5 μ g/ウェルであった。Sp-NLSNLSの使用によって、タンパク質 μ gあたり0.38ng β -galの活性 (「LIPOFECTAMINE」単独のピークの5倍よりも高い) が、0.1 μ g DNAおよび1 μ L「LIPOFECTAMINE」を用いるトランスフェクシ

50

ンにおいて達成され得る。これらの条件下におけるタンパク質収量は、85.5 µg/ウェルであり、これは、「LIPOFECTAMINE」単独のピークより25%高い。この違いは、他の細胞タイプにおいても同様に見られる（データは示さず）。同様の収率が、同じ脂質およびDNA濃度の「LIPOFECTAMINE」単独およびSp-NLSNLS-プレ複合体化DNAでみられる（データは示さず）ので、増強した収率は、より低い脂質およびDNA濃度を使用することによると最も思われる。

実施例4：ペプチドおよびDNAにプレ複合体化したペプチド誘導体によるヒト線維芽細胞における「LIPOFECTAMINE」トランスフェクションの増強

表7は、様々なペプチドおよびペプチド誘導体と組み合わせた「LIPOFECTAMINE」についてのトランスフェクション活性を比較する。トランスフェクションは、実施例3に記載の
10
ようなONPGアッセイを使用して、pCMSPORT β galまたはpCMV β を使用してヒト線維芽細胞（指示されたものを除く）で行った。実験を、0.4 µg DNA/トランスフェクション（指示されたものを除く）を使用して24ウェルプレートで行った。実施例3に記載したプロトコルを、最初にDNAに添加したペプチドを用いて使用した。表7中のデータは、「LIPOFECTAMINE」とペプチドもしくは改変ペプチドについてのピーク活性の増強倍である。いくつかの場合におけるHPLCによるペプチドの精製の間に、2つのピークが単離された。K16NLS（ピーク2）は、アルギニン残基（R）にMtr-保護基を保持すると思われる不完全に脱保護された物質である。最も好ましいトランスフェクション増強剤は、増強剤の最低量で最高の増強倍（カチオン性脂質のみと比べて）を与えるそれらのペプチドまたはペプチド誘導体である。逆NLSペプチドが、「LIPOFECTAMINE」を用いるトランスフェクションの増強
20
を全く示さなかったことに留意されたい。

実施例5：特定のペプチド誘導体の存在下のDMRIE-Cのトランスフェクション活性

表8は、懸濁細胞株（K562およびJurkat細胞）のトランスフェクションについて、いくつかの異なるペプチド（もしくはペプチド誘導体またはそれらの組み合わせ）と組み合わせたDMRIE-Cについてのトランスフェクション活性を比較する。

DMRIE-Cは、膜濾過水中のカチオン性脂質DMRIE（1,2-ジミリスチルオキシプロピル-1-3-ジメチルヒドロキシエチルアンモニウムブロミド）およびコレステロールを有する1：1（M/M）のリポソーム処方物である。K.SchifferliおよびV.Ciccarone（1996）「FOCUS」1
8：45ならびにV.Ciccaroneら．（1995）「FOCUS」17：84を参照のこと。トランスフェクションを、pCMVSPORTCATを使用して行い、アッセイをCAT活性を使用して行った。種々の量
30
のペプチド誘導体（もしくはこのような誘導体の混合物）を組み合わせ、DNAと15分間ブレインキュベートした。次いで、プレ複合体化DNA-ペプチド（およびもしくはペプチド誘導体）複合体を、1.6 µL DMRIE-Cと混合した。次いで、トランスフェクション組成物を、24ウェルプレートにおいて4×10⁵細胞/ウェルと混合した。CATアッセイを、トランスフェクション後36～48時間で行った。

クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）アッセイを、J.R.Neumanら．（1987）BioTechniques 5：444に記載のように行った。手短に言えば、ウェルから採取した細胞を、PBSで洗浄し、懸濁細胞について室温で5分間1000rpm（約600×G）の遠心分離によってペレット化した。ペレットを氷上におき、0.1%TRITON X-100を含む0.1M Tris-HCl（pH 8.0）の1mlを加え、次に-70℃2時間凍結した。ペレットを37℃で解凍し、次に氷で
40
冷却した。細胞溶解物を、5分間微量遠心分離機において最高速度で遠心分離した。上清を集め、デアセチラーゼおよびCAT反応の他のインヒビターを失活させるために10分間65℃で加熱した。加熱した上清（今後、細胞抽出物）を、3分間最高速度で遠心し、-70℃で保存した。

それぞれの細胞抽出サンプルについて、5～150 µLの細胞抽出物を加え、0.1M Tris-HCl（pH 8.0）で150 µLにする。ネガティブコントロールは、150 µLの0.1M Tris-HCl（pH 8.0）であり；ポジティブコントロールは、0.1M Tris-HCl（pH 8.0）で150 µLとしたCAT標準溶液（1、5、10、20、および50mUのCAT）である。10 µLの1M Tris-HCl（pH 8.0）；1 µLの250mM クロラムフェニコール（100%エタノール中）；5 µL（50nCi）[¹⁴C-ブチリル（butyryl）コエンザイムA（0.010 µCi/µL）]；84 µLの脱イオン蒸留水の混合物100
50

μLをそれぞれのサンプルに加え、2時間37℃でインキュベートする。それぞれのサンプルに「ECONOFLUOR」を3mlに加え、2時間室温でインキュベートする。液体シンチレーションカウンターにて0.5分間それぞれのサンプルをカウントする。

表8は、使用したペプチドで観察された最も高い増強倍およびその増強レベルを達成するために必要とされたペプチド（もしくは誘導体）の量を列挙する。

実施例6：デンドリマー媒介性トランスフェクションの増強

リジン[Lys DMER]またはアルギニン[Arg DMER]で改変された「STARBULAST」ポリアミドアミン（PAMAM）デンドリマー：G7（EDA）、G9（EDA）、およびG6（EDA）ならびに「COMB BURST」（商標、Dendritech Inc.）デンドリグラフトを、Michigan Molecular Instituteより入手した。PAMAMデンドリマーを、例えば、Tomalia D.A.およびDurst, H.D. (1993) 10
において、Weber E. (編) Topics in Current Chemistry, 165: 「Supramolecular Chemistry I-Directed Synthesis and Molecular Recognition, Springer-Verlag, Berlin 193-313頁ならびにTomalia D.A.ら、(1990) Angew.Chem.Intl.Ed.Engl.29: 138-175に記載される現在の標準的方法により調製した。これらの改変デンドリマーをトリフルオロ酢酸塩として保存する。Lys DMERは 2.07×10^{15} +電荷/μgの電荷密度を有し；Arg DMERは 2.41×10^{15} +電荷/μgの電荷密度を有する。「COMB BURST」デンドリグラフトを3ジェネレーションまで増殖させ、次いで一層のPAMAMの繰り返しユニットで改変し、分子量30,000、多分散性1.11および電荷密度 2.68×10^{15} +電荷/μgのポリマーを得る。

デンドリマー媒介性トランスフェクションのペプチドおよびスベルミンペプチド結合体の効果を、COS-7細胞（ATCC）のトランスフェクションで評価した。デンドリマートランスフェクションを本質的に、Kukowska-Latallo J.Fら、(1996) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93: 4897-4902に記載のように実施した。COS-7細胞を24ウェルプレートに 4×10^4 細胞/ウェルでプレートした。2つのDNAプラスミド、X-gal染色のためのpCMVβ、およびルシフェラーゼアッセイのためのpGL3（Promega）を両者とも0.5μg/ウェルで使用した。全てのデンドリマーを3μg/ウェルで使用し、そしてクロロキンを全てのデンドリマートランスフェクション物に25μg/mL添加した。デンドリマートランスフェクション物を「LIPOFECTAMINE」トランスフェクション物と1μL/ウェル使用して比較した。3つのペプチド、1μg/ウェル添加されたK16NLS（ピーク2、不完全な逆ブロック）、1.5μg/ウェル添加されたSp-NLSNLS、および20μg/ウェル添加されたNLSの影響を決定した。

ルシフェラーゼアッセイについては、各ウェルを0.15mlの溶解緩衝液（25mM Tris HCl, pH 8.0、0.1mM EDTA、10% グリセロール、0.1% Triton X 100）中に抽出し、そして10μlの各ウェルからの遠心分離上清抽出物を50μLのルシフェラーゼアッセイ試薬（Promega）と自動的に混合し、そして照度計で5秒間アッセイした。X-galアッセイを実施例3のように実施した。

ルシフェラーゼアッセイの結果を表9に列挙する。表11の各デンドリマーのトランスフェクション活性を、3つのペプチドまたは試験したペプチド結合体により増強した。COS-7細胞のトランスフェクションについて最も活性なデンドリマーは、Arg DMERおよび「COMB BURST」であった。これらの実験では、トランスフェクションは、デンドリマー濃度または添加したペプチドの量について最適化されていなかった。X-galアッセイは、表9に示されたデータと一致した。

実施例7：NIH3T3細胞での安定したトランスフェクション頻度に対するSp-NLSNLSの効果
NIH3T3細胞を、24ウェルプレートに10%のウシ血清を補充したDMEMに 6×10^4 細胞/ウェルで播種し、そして一晩増殖させた。細胞を、0μl、1μl、2μl、3μl、および4μlの「LIPOFECTAMINE」、ならびに0.1μg、0.2μg、0.4μg、および0.8μgのpSV2neo（ATCCより入手、ネオマイシン耐性遺伝子を保有、Bergら、(1982) J.Mol.Appl.Genet.1: 327-341を参照のこと）を使用したマトリックスフォーマットでトランスフェクトした。DNAを2μg（0.1~0.4μgのDNAについて）または4μg（0.8μgのDNAについて）のペプチドとともにプレインキュベートした。コントロールDNAをペプチドなし（ここでは、Sp-NLSNLS、配列については表5を参照のこと）で提供した。トランスフェクションの24時間後、細胞を、増殖培地を含む35mmプレート中に1:150に分け、そして一晩増殖させた。次の日、

10

20

30

40

50

細胞を0.6mg/mlの「GENETICIN」(G418硫酸塩、Gibco/BRL:Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD)を含む選択培地に加えた。10日後、プレートを固定し、そして0.4%のトリジンブルーを含む10%のホルマリン/PBSで染色した。G-418耐性コロニーを計数し、そしてプレートされた細胞の最初の数の%として示す。図4A(ペプチド無しのコントロール)および図4B(Sp-NLSNLS添加)は、この実験の結果を示す。Sp-NLSNLSによるトランスフェクションの有意な増強が、ほとんど全ての場合で観察される。

実施例8。一価カチオン性脂質試薬によるトランスフェクションに対するSp-NLSNLSの効果

別々の実験において、10%のウシ胎仔血清を補充したDMEMの24-ウェルプレート中にBHK-21細胞を 2×10^4 細胞/ウェルで播種し、COS-7細胞を 5×10^4 細胞/ウェルで播種し、CHO-K1細胞を 6×10^4 細胞/ウェルで播種し、ヒト線維芽細胞を 8×10^4 細胞/ウェルで播種し、およびHT29細胞を 1×10^5 細胞/ウェルで播種し、そして一晩増殖させた。細胞を0~4mlの「LIPOFECTIN」「LIPOFECTACE」(ジメチル-ジオクタデシル-アンモニウムブロミド(DDAB)およびDOPEの比率が1:2.5)またはDMRIE-DOPE(1:1のモル比で1mg/ml)および0~15mgのSp-NLSNLSペプチドで予め複合体化された0.4mgのpCMVSPORTbgalプラスミドDNAを使用して、実施例3に記載のようにトランスフェクトした。トランスフェクションの24時間後、細胞を実施例2に記載のように回収した。溶解物を、Tropix(V.K.JainおよびI.T.Magrath(1991) Anal. Biochem. 199:119-124)の発光アッセイを使用してb-ガラクトシダーゼ活性についてアッセイした。表10は、DNA単独またはSp-NLSNLSペプチドと予め複合体化したDNAを有する一価カチオン性脂質の濃度の範囲でのトランスフェクションの活性ピークを示す。明らかな増強がほとんどの場合で見られる。

実施例9.DOSPA-DOPEと異なる多価カチオン性脂質試薬によるトランスフェクションに対するSp-NLSNLSの効果

別々の実験において、CHO-K1細胞およびNIH3T3細胞を 6×10^4 細胞/ウェル、およびヒト線維芽細胞を 8×10^4 細胞/ウェルで、24-ウェルのプレート中の10%のウシ胎仔血清(NIH3T3についての10%のウシ血清)を補充したDMEMに播種し、そして一晩増殖させた。細胞を、0~4mlの「CELLFECTIN」TMDOS、「DOSPER」または「MULTIFECTOR」、および0~40mgのSp-NLSNLSペプチドと予め複合体化した0.4mgのpCMVSPORTbgalプラスミドDNAを使用して、実施例3に記載のようにトランスフェクトした。トランスフェクションから24時間後、細胞を実施例2に記載のように回収した。溶解物を、ONPG(実施例2を参照のこと)またはTropix(実施例8を参照のこと)の発光アッセイを使用して、b-ガラクトシダーゼ活性についてアッセイした。表11は、DNA単独またはSp-NLSNLSペプチドと予め複合体化したDNAを有する多価カチオン性脂質のある範囲の濃度でのトランスフェクションの活性ピークを示す。明らかな増強が見られる。

実施例10.活性化デンドリマー「SUPERFECT」によるトランスフェクションに対するSp-NLSNLSの効果

COS-7細胞を10%のウシ胎仔血清を補充したDMEMの24-ウェルプレート中に 4×10^4 細胞/ウェルで播種し、そして一晩増殖させた。細胞を、0~4mlの「SUPERFECT」、および0~5mgのSp-NLSNLSペプチドと予め複合体化した0.4mgのpCMVSPORTbgalプラスミドDNAを使用して、実施例3に記載のようにトランスフェクトした。トランスフェクションから24時間後、細胞を実施例2に記載のように回収した。溶解物を、Tropix(実施例8を参照のこと)の発光アッセイを使用してb-ガラクトシダーゼ活性についてアッセイした。表12は、DNA単独またはSp-NLSNLSペプチドと前複合体化したDNAを有するデンドリマーの濃度の範囲でのトランスフェクションの活性ピークを示す。明らかな増強が見られる。

実施例11.「LIPOFECTAMINE」によるトランスフェクションに対するTATペプチドおよびTATスペルミンペプチドの効果

2通りのTATペプチドを合成した:N末端にDNA結合基のカルボキシスペルミンを有するもの、および有さないもの。使用したTAT中央部の配列は、CGYGRKKRRQRRRGである。カチオン性脂質媒介トランスフェクションを増強するTATペプチドおよびカルボキシスペルミン改変TATペプチドの能力を試験した。

10

20

30

40

50

トランスフェクションをNIH/3T3細胞で、24ウェルプレートにおいて実施した。播種密度は、 6×10^4 細胞/ウェルであった。各条件について、複合化については標準的なPLUSプロトコルを使用した（実施例3を参照のこと）。全ての複合体をOptiMEM還元血清培地で調製した。細胞を回収し、そして発光アッセイ（実施例8を参照のこと）により可溶性抽出物中での β -ガラクトシダーゼ活性についてアッセイした。表13は、DNA単独で、またはTatペプチドまたはTatスペルミンペプチドと予め複合体化させて、「LIPOFECTAMINE」のある範囲の濃度でのトランスフェクションのピーク活性を示す。明らかな増強が見られる。実施例12、「LIPOFECTAMINE」および「LIPOFECTIN」によるトランスフェクションに対する、DNA予備複合体中のSp-NLSNLSレセプターーリガンドタンパク質包含の効果

別々の実験において、10%のウシ胎仔血清を補充したDMEMの24-ウェルプレート中で、CHO-K1細胞を、 6×10^4 細胞/ウェルで播種し、そしてヒト線維芽細胞を 8×10^4 細胞/ウェルで播種し、そして一晩増殖させた。細胞を、 $0 \sim 5 \mu\text{l}$ の「LIPOFECTAMINE」「LIPOFECTIN」または「DMRIE-DOPE」、および $0 \sim 40 \mu\text{g}$ のSp-NLSNLSペプチドまたはSp-NLSNLSペプチドの混合物と予め複合体化された $0.4 \mu\text{g}$ のpCMVSPORT β galプラスミドDNA、ならびに $1 \sim 2 \mu\text{g}$ のインスリンまたは $2 \sim 4 \mu\text{g}$ のトランスフェリン、または $1 \sim 4 \mu\text{g}$ のインスリンおよびトランスフェリンの両方を使用して実施例3に記載のようにトランスフェクトした。トランスフェクションから24時間後、細胞を実施例2に記載のように回収した。溶解物を、ONPG（実施例2を参照のこと）またはTropix（実施例8を参照のこと）の発光アッセイを使用して β -ガラクトシダーゼ活性についてアッセイした。表14は、DNA単独で、またはSp-NLSNLSペプチド+/-リガンドタンパク質と予め複合体化したDNAで、脂質のある範囲の濃度でのトランスフェクションの活性ピークを示す。混合物中のリガンドタンパク質の包含により生じる、明らかな増強が見られる。

実施例13.lipofectAMINE試薬によるトランスフェクションに対する接着タンパク質フラグメントの効果

COS-7細胞を10%のウシ胎仔血清を補充したDMEMの24-ウェルプレート中に 5×10^4 細胞/ウェルで播種し、そして一晩増殖させた。細胞を、 $0 \sim 2.4 \mu\text{l}$ の「LIPOFECTAMINE」および $0 \mu\text{g}$ または $10 \mu\text{g}$ の「RETRONECTIN」と予め複合体化された $0.8 \mu\text{g}$ のpCMVSPORT β galプラスミドDNAを使用して、実施例3に記載のようにトランスフェクトした。トランスフェクションから24時間後、細胞を実施例2に記載のように回収した。溶解物を、ONPG（実施例2を参照のこと）を使用して β -ガラクトシダーゼ活性についてアッセイした。表15は、DNA単独で、または「RETRONECTIN」と予め複合体化されたDNAでの、「LIPOFECTAMINE」のある範囲での濃度でのトランスフェクションの活性ピークを示す。明らかな増強が見られる。

当業者は、本明細書に具体的に記載される以外の試薬開始物質、増殖培地、技術および方法が、本発明のトランスフェクション組成物、キット、脂質凝集体、ペプチドおよびタンパク質結合体、改変ペプチドおよびタンパク質、脂質、デンドリマー、ならびにそのペプチドおよびタンパク質結合体の調製および使用において、本発明の精神および範囲から逸脱することなく使用され得ることを理解する。

表 1: 細胞接着タンパク質の例

リガンド	結合領域	参考文献
フィブロネクチン	RGD 細胞結合領域 (全てのモチーフ)	Pierschbacher & Ruoslahti (1987) <i>J. Biol. Chem.</i> 262, 17294-17298
フィブロネクチン1	全ての細胞結合領域を含む -RGD 細胞結合領域 (全てのモチーフ)	Pierschbacher & Ruoslahti (1984) <i>Nature</i> 309, 30-33
フィブロネクチン2	-RGD 細胞結合領域 (REDV/RGDV)	Humphries et al., (1986) <i>J. Cell Biol.</i> 103, 2637-2647
フィブロネクチン3	-CS1 フラグメント1	Humphries et al., (1987) <i>J. Biol. Chem.</i> 262, 6886-6892
ビトロネクチン	-RGD 細胞結合領域 (RGDV)	Suzuki et al., (1985) <i>EMBO J.</i> 4, 2519-2524
ラミニン 3	-RGD 細胞結合領域 (RGDN)	Grant et al., (1989) <i>Cell</i> 58, 933-943
テネイシン 1	-RGD 細胞結合領域 (RGDM)	Friedlander et al., (1988) <i>J. Cell Biol.</i> 107, 2329-2340
コラーゲン 1	-RGD 細胞結合領域 (RGDT)	Dedhar et al., (1988) <i>J. Cell Biol.</i> 104, 585-593
コラーゲン 6	-RGD 細胞結合領域 (RGDX')	Aumailley et al., (1989) <i>Cell Res.</i> 181, 463-474

10

20

30

40

表 1: (続き)

フォンビールブラント 因子	-RGD	細胞結合領域 (RGDS)	Haverstick et al, (1985) <i>Blood</i> 66, 946-952
フィブリノーゲン1	-RGD	細胞結合領域 (RGDS)	Gardner and Hynes et al., (1985) <i>Cell</i> 42, 439-448
トロンボスポンジン 1	-RGD	細胞結合領域 (RGDA)	Lawler et al., (1988) <i>J. Cell Biol.</i> 107, 2351-2361

¹CS1 ペプチド結合 : DELPQLVTLPHPNLHGPEILDVPST

X = 種々のアミノ酸

10

20

30

40

表 2: トランスフェクションを増強するための例示的なペプチド

NLS- ベース	PKKKRKV
	(±C)G(Y _{±CH} W _{±CH} -)GPKKKRKVGG
	C(±Y _{±CH} W)PKKKRKVGG
	(±C)G(±Y _{±CH} W)GPKKKRKVGG(±G) _n
	(Xaa) ₁ PKKKRKV(Zaa) ₂
	(Xaa) ₁ (±Y _{±CH} W)PKKKRKV(Zaa) ₂
	(Xaa) ₁ (±Y _{±CH} W)(Jaa) ₁ PKKKRKV(Zaa) ₂
	(Xaa) ₁ PKKKRKV(±Y _{±CH} W)(Zaa) ₂
	(Xaa) ₁ (±C)(±Y _{±CH} W)(Jaa) ₁ PKKKRKV(±C)(Zaa) ₂
	(Xaa) ₁ (±C)(±Y _{±CH} W)(Jaa) ₁ PKKKRKV(±C)(Zaa) ₂ (Uaa _{±CH} Sp _{±CH} Poly) ₃
	(±C)(Xaa) ₁ (±Y _{±CH} W)(Jaa) ₁ PKKKRKV(Zaa) ₂ (±C)
	(±C)(Xaa) ₁ (±Y _{±CH} W)(Jaa) ₁ PKKKRKV(±C)(Zaa) ₂ (Uaa _{±CH} Sp _{±CH} Poly) ₃
	Uaa _{±CH} Sp _{±CH} Poly) ₃ (Xaa) ₁ (±C)(±Y _{±CH} W)(Jaa) ₁ PKKKRKV(Zaa) ₂ (±C)
	(Uaa _{±CH} Sp _{±CH} Poly) ₃ (Xaa) ₁ (±C)(±Y _{±CH} W)(Jaa) ₁ PKKKRKV(±C)(Zaa) ₂
NLS- コンカデマー	[(Xaa) ₁ (±C)(±Y _{±CH} W)(Jaa) ₁ PKKKRKV(±C)(Zaa) ₂] _p
	[(Xaa) ₁ (±C)(±Y _{±CH} W)(Jaa) ₁ PKKKRKV(±C)(Zaa) ₂] _p (Uaa _{±CH} Sp _{±CH} Poly) ₃
	(Uaa _{±CH} Sp _{±CH} Poly) ₃ [(Xaa) ₁ (±C)(±Y _{±CH} W)(Jaa) ₁ PKKKRKV(±C)(Zaa) ₂] _p
RGD(SP)	RGDSP
	(±C)RGDSP(±C)
	(±C)(±G)RGDSP(±C)
	(Xaa) ₁ RGDSP(Zaa) ₂
	(Xaa) ₁ (±C)(±G)RGDSP(±G)(±C)(Zaa) ₂

10

20

30

40

	$(\pm C)(Xaa)_x(\pm G)RGDSP(\pm G)(Zaa)_z(\pm C)$ $(Xaa)_xRGDSPC(Zaa)_z$ $(Uaa_{x+n}Sp_{x+n}Poly)_u(Xaa)_xRGDSP(Zaa)_z$ $(Uaa_{x+n}Sp_{x+n}Poly)_u(Xaa)_x(\pm C)(\pm G)RGDSP(\pm G)(\pm C)(Zaa)_z$ $(Xaa)_x(\pm C)(\pm G)RGDSP(\pm G)(\pm C)(Zaa)_z(Uaa_{x+n}Sp_{x+n}Poly)_u$ $(Uaa_{x+n}Sp_{x+n}Poly)_u(Xaa)_x(\pm C)(\pm G)RGDSP(\pm G)(Zaa)_z(\pm C)$ $(\pm C)(Xaa)_x(\pm G)RGDSP(\pm G)(\pm C)(Zaa)_z(Uaa_{x+n}Sp_{x+n}Poly)_u$ $(Xaa)_xRGDSP(Zaa)_z(Uaa_{x+n}Sp_{x+n}Poly)_u$
	RGDMF $(\pm C)GRGDMF(\pm C)$ GRGDMFC $(\pm C)(\pm G)RGDMF(\pm G)(\pm C)$ $(Xaa)_xRGDMF(Zaa)_z$ $(Xaa)_x(\pm C)(\pm G)RGDMF(\pm G)(\pm C)(Zaa)_z$ $(\pm C)(Xaa)_xRGDMF(Zaa)_z(\pm C)$ $(Xaa)_x(\pm C)RGDMF(\pm C)(Zaa)_z$ $(Uaa_{x+n}Sp_{x+n}Poly)_u(Xaa)_x(\pm C)(\pm G)RGDMF(\pm G)(Zaa)_z(\pm C)$ $(\pm C)(Xaa)_x(\pm G)RGDMF(\pm G)(\pm C)(Zaa)_z(Uaa_{x+n}Sp_{x+n}Poly)_u$ $(Uaa_{x+n}Sp_{x+n}Poly)_u(Xaa)_x(\pm C)(\pm G)RGDMF(\pm G)(\pm C)(Zaa)_z$ $(Xaa)_x(\pm C)(\pm G)RGDMF(\pm G)(\pm C)(Zaa)_z(Uaa_{x+n}Sp_{x+n}Poly)_u$
RGD(MF)	RGDMF $(\pm C)GRGDMF(\pm C)$ GRGDMFC $(\pm C)(\pm G)RGDMF(\pm G)(\pm C)$ $(Xaa)_xRGDMF(Zaa)_z$ $(Xaa)_x(\pm C)(\pm G)RGDMF(\pm G)(\pm C)(Zaa)_z$ $(\pm C)(Xaa)_xRGDMF(Zaa)_z(\pm C)$ $(Xaa)_x(\pm C)RGDMF(\pm C)(Zaa)_z$ $(Uaa_{x+n}Sp_{x+n}Poly)_u(Xaa)_x(\pm C)(\pm G)RGDMF(\pm G)(Zaa)_z(\pm C)$ $(\pm C)(Xaa)_x(\pm G)RGDMF(\pm G)(\pm C)(Zaa)_z(Uaa_{x+n}Sp_{x+n}Poly)_u$ $(Uaa_{x+n}Sp_{x+n}Poly)_u(Xaa)_x(\pm C)(\pm G)RGDMF(\pm G)(\pm C)(Zaa)_z$ $(Xaa)_x(\pm C)(\pm G)RGDMF(\pm G)(\pm C)(Zaa)_z(Uaa_{x+n}Sp_{x+n}Poly)_u$
CS-1 ベフチド	DELPQLVTLPHPNLHGPEILDVPST $(\pm C)DELPQLVTLPHPNLHGPEILDVPST(\pm C)$ $(Xaa)_xDELPQLVTLPHPNLHGPEILDVPST(Zaa)_z$ $(Xaa)_x(\pm C)DELPQLVTLPHPNLHGPEILDVPST(\pm C)(Zaa)_z$ $(\pm C)(Xaa)_xDELPQLVTLPHPNLHGPEILDVPST(Zaa)_z(\pm C)$

10

20

30

40

	(Uaa ₁ Sp ₁ Poly) ₁ (Xaa) ₁ (±C)DELPQLVTLPHPNLHGPEILDVPST(Zaa) ₁ (±C)
	(Uaa ₁ Sp ₁ Poly) ₁ (Xaa) ₁ (±C)DELPQLVTLPHPNLHGPEILDVPST(±C)(Zaa) ₁
	(±C)(Xaa) ₁ DELPQLVTLPHPNLHGPEILDVPST(±C)(Zaa) ₁ (Uaa ₁ Sp ₁ Poly) ₁
	(Xaa) ₁ (±C)DELPQLVTLPHPNLHGPEILDVPST(±C)(Zaa) ₁ (Uaa ₁ Sp ₁ Poly) ₁
	(Xaa) ₁ DELPQLVTLPHPNLHGPEILDVPST(Zaa) ₁ (Uaa ₁ Sp ₁ Poly) ₁
	(Uaa ₁ Sp ₁ Poly) ₁ (Xaa) ₁ DELPQLVTLPHPNLHGPEILDVPST(Zaa) ₁
	EILDVPST
	(±C)EILDVPST(±C)
	(Xaa) ₁ EILDVPST(Zaa) ₁
	(Xaa) ₁ (±C)EILDVPST(±C)(Zaa) ₁
	(±C)(Xaa) ₁ EILDVPST(Zaa) ₁ (±C)
	(Uaa ₁ Sp ₁ Poly) ₁ (Xaa) ₁ EILDVPST(Zaa) ₁
	(Uaa ₁ Sp ₁ Poly) ₁ (Xaa) ₁ (±C)EILDVPST(±C)(Zaa) ₁
	(Uaa ₁ Sp ₁ Poly) ₁ (Xaa) ₁ (±C)EILDVPST(Zaa) ₁ (±C)
	(Xaa) ₁ EILDVPST(Zaa) ₁ (Uaa ₁ Sp ₁ Poly) ₁
	(±C)(Xaa) ₁ EILDVPST(±C)(Zaa) ₁ (Uaa ₁ Sp ₁ Poly) ₁
	(Xaa) ₁ (±C)EILDVPST(±C)(Zaa) ₁ (Uaa ₁ Sp ₁ Poly) ₁
	KFTIVF
	(±C)KFTIVF(±C)
	(Xaa) ₁ KFTIVF(Zaa) ₁
	(Xaa) ₁ (±C)KFTIVF(±C)(Zaa) ₁
	(±C)(Xaa) ₁ KFTIVF(Zaa) ₁ (±C)
	(Uaa ₁ Sp ₁ Poly) ₁ (Xaa) ₁ KFTIVF(Zaa) ₁
	(Uaa ₁ Sp ₁ Poly) ₁ (Xaa) ₁ (±C)KFTIVF(±C)(Zaa) ₁
	(Uaa ₁ Sp ₁ Poly) ₁ (Xaa) ₁ (±C)KFTIVF(Zaa) ₁ (±C)

LDV

(CS-1の

活性部分)

VSVG

6.7-

10

20

30

40

コンカチマー	$(Xaa)_x KFTIVF(Zaa)_z (Uaa)_{x+z} Sp_{x+z} Poly)_u$
	$(\pm C)(Xaa)_x KFTIVF(\pm C)(Zaa)_z (Uaa)_{x+z} Sp_{x+z} Poly)_u$
	$(Xaa)_x (\pm C) KFTIVF(\pm C)(Zaa)_z (Uaa)_{x+z} Sp_{x+z} Poly)_u$
	$[(Xaa)_x (\pm C) RGDSP(\pm C)(Zaa)_z]_p$
	$(Uaa)_{x+z} Sp_{x+z} Poly)_u [(Xaa)_x (\pm C) RGDSP(\pm C)(Zaa)_z]_p$
	$[(Xaa)_x (\pm C) RGDSP(\pm C)(Zaa)_z]_p$
	$(Uaa)_{x+z} Sp_{x+z} Poly)_u [(Xaa)_x (\pm C) RGDSP(\pm C)(Zaa)_z]_p$
	$[(Xaa)_x (\pm C) DELPQLVTLPHPNLHGPEILDVPST(\pm C)(Zaa)_z]_p$
	$(Uaa)_{x+z} Sp_{x+z} Poly)_u [(Xaa)_x (\pm C) DELPQLVTLPHPNLHGPEILDVPST(\pm C)(Zaa)_z]_p$
	$[(Xaa)_x (\pm C) DELPQLVTLPHPNLHGPEILDVPST(\pm C)(Zaa)_z]_p (Uaa)_{x+z} Sp_{x+z} Poly)_u$
	$[(Xaa)_x (\pm C) EILDVPST(\pm C)(Zaa)_z]_p$
	$(Uaa)_{x+z} Sp_{x+z} Poly)_u [(Xaa)_x (\pm C) EILDVPST(\pm C)(Zaa)_z]_p$
	$[(Xaa)_x (\pm C) KFTIVF(\pm C)(Zaa)_z]_p$
	$(Uaa)_{x+z} Sp_{x+z} Poly)_u [(Xaa)_x (\pm C) KFTIVF(\pm C)(Zaa)_z]_p$
	$(\pm C)[(Xaa)_x RGDSP(Zaa)_z]_p (\pm C)$
	$(Uaa)_{x+z} Sp_{x+z} Poly)_u [(Xaa)_x (\pm C) RGDSP(Zaa)_z]_p (\pm C)$
	$(\pm C)(Xaa)_x RGDSP(Zaa)_z]_p (\pm C)$
	$(Uaa)_{x+z} Sp_{x+z} Poly)_u [(Xaa)_x (\pm C) RGDSP(Zaa)_z]_p (\pm C)$
	$(\pm C)[(Xaa)_x RGDSP(Zaa)_z]_p (\pm C)$
	$(Uaa)_{x+z} Sp_{x+z} Poly)_u [(Xaa)_x (\pm C) DELPQLVTLPHPNLHGPEILDVPST(Zaa)_z]_p (\pm C)$
	$(\pm C)[(Xaa)_x DELPQLVTLPHPNLHGPEILDVPST(Zaa)_z]_p (\pm C)$
	$(Uaa)_{x+z} Sp_{x+z} Poly)_u [(Xaa)_x (\pm C) EILDVPST(Zaa)_z]_p (\pm C)$
	$(\pm C)[(Xaa)_x KFTIVF(Zaa)_z]_p (\pm C)$
	$(Uaa)_{x+z} Sp_{x+z} Poly)_u [(Xaa)_x (\pm C) KFTIVF(Zaa)_z]_p (\pm C)$

10

20

30

40

混合 コンカテマー	$[(Baa)_b(\pm C)(\pm Y_{*nH} W)(Xaa)_x PKKKRKV(Jaa)_j RGDMF(\pm C)(Zaa)_z]_p$
	$(Uaa_{*nH} Sp_{*nH} Poly)_u [(Baa)_b(\pm C)(Xaa)_x (\pm Y_{*nH} W) PKKKRKV(Jaa)_j RGDMF(\pm C)(Zaa)_z]_p$
	$[(Baa)_b(\pm C)(\pm Y_{*nH} W)(Xaa)_x PKKKRKV(Jaa)_j GRGDSPT(\pm C)(Zaa)_z]_p$
	$(Uaa_{*nH} Sp_{*nH} Poly)_u [(Baa)_b(\pm C)(\pm Y_{*nH} W)(Xaa)_x PKKKRKV(Jaa)_j RGDSPT(\pm C)(Zaa)_z]_p$
	$[(Baa)_b(\pm C)KFTIVF(\pm C)(Xaa)_x(\pm C)(Jaa)_j(\pm Y_{*nH} W)(Xaa)_x PKKKRKV(Zaa)_z]_p$
	$(Uaa_{*nH} Sp_{*nH} Poly)_u [(Baa)_b(\pm C)KFTIVF(\pm C)(Xaa)_x(\pm C)(Jaa)_j(\pm Y_{*nH} W)PKKKRKV(Zaa)_z]_p$
	$[(Baa)_b(\pm C)(\pm Y_{*nH} W)(Xaa)_x GPKKKRKV(Jaa)_j EILDVSPT(\pm C)(Zaa)_z]_p$
	$(Uaa_{*nH} Sp_{*nH} Poly)_u [(Baa)_b(\pm C)(\pm Y_{*nH} W)PKKKRKV(Jaa)_j EILDVSPT(\pm C)(Zaa)_z]_p$
	$[(Baa)_b(\pm C)KFTIVF(\pm C)(Xaa)_x EILDVPST(\pm C)(Zaa)_z]_p$
	$(Uaa_{*nH} Sp_{*nH} Poly)_u [(Baa)_b(\pm C)KFTIVF(\pm C)(Xaa)_x EILDVPST(\pm C)(Zaa)_z]_p$
	$(\pm C)[(Baa)_b(\pm Y_{*nH} W)(Xaa)_x PKKKRKV(Jaa)_j RGDMF(Zaa)_z]_p(\pm C)$
	$(Uaa_{*nH} Sp_{*nH} Poly)_u [(Baa)_b(\pm C)(Xaa)_x (\pm Y_{*nH} W) PKKKRKV(Jaa)_j RGDMF(Zaa)_z]_p(\pm C)$
	$(\pm C)[(Baa)_b(\pm Y_{*nH} W)(Xaa)_x PKKKRKV(Jaa)_j GRGDSPT(Zaa)_z]_p(\pm C)$
	$(Uaa_{*nH} Sp_{*nH} Poly)_u [(Baa)_b(\pm C)(\pm Y_{*nH} W)(Xaa)_x PKKKRKV(Jaa)_j RGDSPT(Zaa)_z]_p(\pm C)$
	$(\pm C)[(Baa)_b KFTIVF(\pm C)(Xaa)_x(\pm C)(Jaa)_j(\pm Y_{*nH} W)(Xaa)_x PKKKRKV(Zaa)_z]_p(\pm C)$
	$(Uaa_{*nH} Sp_{*nH} Poly)_u [(Baa)_b(\pm C)KFTIVF(\pm C)(Xaa)_x(\pm C)(Jaa)_j(\pm Y_{*nH} W)PKKKRKV(Zaa)_z]_p(\pm C)$
	$(\pm C)[(Baa)_b(\pm Y_{*nH} W)(Xaa)_x GPKKKRKV(Jaa)_j EILDVSPT(Zaa)_z]_p(\pm C)$
	$(Uaa_{*nH} Sp_{*nH} Poly)_u [(Baa)_b(\pm C)(\pm Y_{*nH} W)PKKKRKV(Jaa)_j EILDVSPT(Zaa)_z]_p(\pm C)$
	$(\pm C)[(Baa)_b KFTIVF(\pm C)(Xaa)_x EILDVPST(Zaa)_z]_p(\pm C)$
	$(Uaa_{*nH} Sp_{*nH} Poly)_u [(Baa)_b(\pm C)KFTIVF(\pm C)(Xaa)_x EILDVPST(Zaa)_z]_p(\pm C)$
環状	LDV
環状	RGD,
ペントン基部	
$(Uaa_{*nH} Sp_{*nH} Poly)_u (Xaa)_x CHAIRGDTFAC(Zaa)_z$	

10

20

30

40

	CGYGRKKRRQRRRG
TAT ペプチド	($\pm$ C)CGYGRKKRRQRRRG($\pm$ C)
	(Xaa) _x CGYGRKKRRQRRRG(Zaa) _x
	(Xaa) _x ($\pm$ C)CGYGRKKRRQRRRG($\pm$ C)(Zaa) _x
	($\pm$ C)(Xaa) _x CGYGRKKRRQRRRG(Zaa) _x ($\pm$ C)
	(Uaa _{Sp} Poly) _u CGYGRKKRRQRRRG
	(Uaa _{Sp} Poly) _u ($\pm$ C)(Xaa) _x ($\pm$ C)CGYGRKKRRQRRRG($\pm$ C)(Zaa) _x ($\pm$ C)
	($\pm$ C)(Xaa) _x ($\pm$ C)CGYGRKKRRQRRRG($\pm$ C)(Zaa) _x ($\pm$ C)(Uaa _{Sp} Poly) _u
	CGYGRKKRRQRRRG(Jaa) _j CGYGRKKRRQRRRG
	(CGYGRKKRRQRRRG) _p
	[(Jaa) _j CGYGRKKRRQRRRG] _p
	[($\pm$ C)(Xaa) _x ($\pm$ C)CGYGRKKRRQRRRG($\pm$ C)(Zaa) _x ($\pm$ C)] _p
	(Uaa _{Sp} Poly) _u [($\pm$ C)(Xaa) _x ($\pm$ C)CGYGRKKRRQRRRG($\pm$ C)(Zaa) _x ($\pm$ C)] _p
	[($\pm$ C)(Xaa) _x ($\pm$ C)CGYGRKKRRQRRRG($\pm$ C)(Zaa) _x ($\pm$ C)](Uaa _{Sp} Poly) _u
	K ₁₆ CGYGRKKRRQRRRG
	CGYGRKKRRQRRRGK ₁₆
	NLS-Tat: ($\pm$ K ₁₆)CGYGPKKKKK(Jaa) _j CGYGRKKRRQRRRG
TAT コンカデマー	Tat-NLS: ($\pm$ K ₁₆)CGYGRKKRRQRRRG(Jaa) _j CGYGPKKKKK
	VSVG-Tat: ($\pm$ K ₁₆)KFTTIVFC(Jaa) _j CGYGRKKRRQRRRG
	Tat-VSVG: ($\pm$ K ₁₆)CGYGRKKRRQRRRG(Jaa) _j KFTTIVFC
	Tat-VSVGΔ6: ($\pm$ K ₁₆)CGYGRKKRRQRRRG(Jaa) _j KFTTIVFDDDDDD ($\pm$ G)
	Tat-RGD: ($\pm$ K ₁₆)CGYGRKKRRQRRRG(Jaa) _j RGDSPC
	RGD-Tat: ($\pm$ K ₁₆)RGDSPC(Jaa) _j CGYGRKKRRQRRRG
	Tat-E5: ($\pm$ K ₁₆)CGYGRKKRRQRRRG(Jaa) _j GLFEAIEFIEGGWGLIEG
	E5-Tat: ($\pm$ K ₁₆)GLFEAIEFIEGGWGLIEG(Jaa) _j CGYGRKKRRQRRRG

10

20

30

	HIS-TEV-Tat: MSYYHHHHHDYDIPTTENLYFQGS(Jaa) _j CGYGRKKRRRRG
	6HIS-Tat: MSYYHHHHHH(Jaa) _j CGYGRKKRRRRRG

ここで、b,u,j,x,z,nおよびpは0〜20の範囲であり得る整数であり、Baa,Jaa,Xaa
およびZaaは任意のアミノ酸を示し、そしてVaaは任意のカチオン性アミノ酸を示
すために使用され、名称(Baa)_b、(Xaa)_x、(Jaa)_j、および(Zaa)_zは多重の繰り返し
繰り返し示す。繰り返し示す。

ここで、「±」は、いずれのアミノ酸も任意であることを示し；
ここで、Spは、スぺルミン（カルボキシル結合スぺルミ
ンを含む）であり；
ここで、Polyは、任意の他のポリアミノ酸に使用される。
ここで、標準的な1文字表記がアミノ酸に使用される。

10
20
30
40

表 3: トランスフェクション増強のための特定ペプチドのさらなる例

名称	配列
VSVGD6	GKFTIVFDDDDDD(±G)
VSVGE5	KFTIVFGGGLFEAIAEFIEGGWEGLIEG
E5VSVG	GLFEAIAEFIEGGWEGLIEGCKFTIVF
NLSE5	CGYGGGGGGPKKKRKVGGGLFEAIAEFIEGGWEGLIEG
E5NLS	GLFEAIAEFIEGGWEGLIEGGGYGGGGGGPKKKRKVG
VSVGNLS	KFTTIVFCGYGPKKKRKVGG
NLSVSVG	CGYGPKKKRKVGGKFTIVF
K16VSVGD6	K ₁₆ GKFTIVFDDDDDD(±G)
K16VSVGE5	K ₁₆ KFTIVFGGGLFEAIAEFIEGGWEGLIEG
K16E5VSVG	K ₁₆ GLFEAIAEFIEGGWEGLIEGCKFTIVF
K16E5NLS	K ₁₆ GLFEAIAEFIEGGWEGLIEGGGYGGGGGGPKKKRKVGG
K16VSVGNLS	K ₁₆ KFTTIVFCGYGPKKKRKVGG
K16NLSVSVG	K ₁₆ GGCGYGGGGPKKKRKVGGKFTIVF
K16NLSE5	K ₁₆ GGCGYGGGGGGPKKKRKVGGGLFEAIAEFIEGGWEGLIEG
NLS	SSDDEATADSQHSTPPKKRKVGG
リン酸化	K ₁₆ SSDDEATADSQHSTPPKKRKVGG
HIS-TEV-ペプチド:	MSYYHHHHHHHDYDIPTTENLYFQGS- ペプチド
HIS-TEV-NLS	MSYYHHHHHHHDYDIPTTENLYFQGSYGPKKKRKVGG
HIS-TEV-VSVG	MSYYHHHHHHHDYDIPTTENLYFQGSKFTIVF
HIS-TEV-E5	MSYYHHHHHHHDYDIPTTENLYFQGSGLFEAIAEFIEGGWEGLIEG
HIS-TEV-RGD	MSYYHHHHHHHDYDIPTTENLYFQGSRGDSPC

6HIS- ペプチド	MSYYHHHHHH-ペプチド
6HIS-NLS	MSYYHHHHHHGYGPKKKRKVGG
6HIS-VSVG	MSYYHHHHHHKFTIVF
6HIS-E5	MSYYHHHHHHGLFEAIAEFIEGGWEGLIEG
6HIS-RGD	MSYYHHHHHHRGDSPC
ペプチド-6HIS	ペプチド-HHHHHH

この表のペプチド配列は、ポリアミン（スベルミンを含む）または他の核酸結合基（N 末端または C 末端での一連のカチオン性アミノ酸を含む）と組み合わせられ得る。

表 4: スベルミン結合ペプチドの例

スベルミン結合ペプチド	名称
Sp-5-CO-NH-CH ₂ -CO-GGGGYGPKKKRKVGG	Opf-GG-1
Sp-5-CO-NH-CH ₂ -CO-GYGPKKKRKVG	Opf-GG-2
Sp-5-CO-NH-CH ₂ -CO-CGYGPKKKRKVG	Opf-GG-2-CYS
Sp-5-CO-NH-CH ₂ -CO-GRGDMFGG	Sp-RGD
Sp-5-CO-NH-CH ₂ -CO-YGPKKKRKVGGGGGRGDMFGG	Sp-NLSRGD
Sp-5-CO-NH-CH ₂ -CO-GYGPKKKRKVGGGGYGPKKKRKVGG	Sp-NLSNLS
Sp-5-CO-NH-CH((CH ₂) ₄ -NH-5-CO-Sp)-CO-GGYGPKKKRKVGGGGYGPKKKRKVGG	Sp ₂ --NLSNLS

自動化固相ペプチド合成を使用して調製

表 5: トランスフェクション培地への含有による、ヒト線維芽細胞における「LIPOFECTAMINE」トランスフェクションの増強について試験された非改変型ペプチド

名称	配列	トランスフェクションの増強	ペプチド量 μM
E5	GLFEAIAEFIEGGWEGLIEG	図1を参照	0.1
K5	GLFKAIKFIKGGWKGLIKG	"	5
HApep	GLFGAIAGFIENGWEGMIDG	"	10
VSVG	KFTIVF	"	1

表 6: 「LIPOFECTAMINE」トランスフェクション+/-Sp-NLSNLSの比較

トランスフェクション 試薬	トランスフェクションの条件:		比活性	タンパク質収量
	DNA (μg)	脂質 (μl)	ng β-gal/ μg タンパク質	μg/ ウェル
"LIPOFECTAMINE"	0.4	2	0.07	67.5
"LIPOFECTAMINE" + Sp-NLSNLS	0.1	1	0.38	85.5

表 7: ペプチドおよび誘導体化ペプチドについてのヒト線維芽細胞における「LPOFECTAMINE」トランスフェクションの増強

名称	配列	増強	ペプチド量: (mg / 0.4 mg DNA)
NLS	GYGPKKKRKVGG	7-10	20
Opf-GG-1	Sp-5-CO-GGGGYGPKKKRKVGG	4	6
Opf-GG-2 (ピーク1)	Sp-5-CO-GGYGPKKKRKVG	5	10
Opf-GG-2 (ピーク2)	部分的脱プロック化 Sp-5-CO-GGYGPKKKRKVG	7	2
Opf-GG-2-CYS (ピーク1)	Sp-5-CO-GCGYGPKKKRKVG	5	10
Opf-GG-2-CYS (ピーク2)	部分的脱プロック化 Sp-5-CO-GCGYGPKKKRKVG	7	20
SpRGD	Sp-5-CO-GGRGDMFGG	5 ³	12 ³
SpNLSRGD	Sp-5-CO-GYGPKKKRKVGGGGGRGDMFGG	4	20
SpNLSNLS	Sp-5-CO-GGYGPKKKRKVGGGGYGPKKKRKVG	7-10	4
K16NLS (ピーク1)	K ₁₆ GGCGYGPKKKRKVG	5	10
" (ピーク2)	部分的脱プロック化 K ₁₆ GGCGYGPKKKRKVG	6	0.5
K16NLSRGD	K ₁₆ CGYGPKKKRKVGGGGRGDS	10	2

10

20

30

40

表7 続き				
K16RGD	K ₁₆ GGRGDSPCG		10	2
RGDK16	GRGDSPCGGK ₁₆		6	5
K16	K ₁₆		2	0.5
G61934P NLSRGD	CGYGPKKKRKVGGRGDSPCG		8	20

¹ この表の結果は一連の実験からまとられた。すなわち、ペオチチドは同一実験では、全く比較されていいない。データはトランスフェクションあたり0.4mgのDNAでの、24ウェルプレート中のヒト線維芽細胞(他に記述がない限り)におけるピーク活性時の「LIPOFECTAMINE」トランスフェクションの増強倍数である。トランスフェクトされたDNAはpCMVSPORT β galまたは、pCMV β のいずれかであり、そしてこのアッセイは全てONPGで行った。

² これらのペプチドは自動化ペプチド合成後、部分的にのみ脱保護されており、そして、HPLCの分離ピークとして完全に脱保護されたペプチドの副生成物として単離された。これらのペプチドは1個の保護基(Mtr)を保有し、そして保護基はPKKKRK配列(NLS)のR残基上にあると考えられる。R-Mtrは、一般に脱保護がより困難である。ペプチドに残存する保護基(すなわち、ブロック基)は自動化ペプチド合成のための従来のアミノ酸ブロック基である、Mtr基である。

³ この実験はCHO-K1細胞を使用して行われ、そして使用したDNA(pCMVSPORT β galまたは、pCMV β)の量は24ウェルプレートのウェルあたり0.2mgのDNAである。

表 8: ヒト懸濁細胞 (K562 または Jurkat 細胞) におけるペプチドによる DMRIE-C トランスフェクションの増強

ペプチド/細胞型	増強 (倍)	ペプチド 量 μg/0.4μg DNA	DMRIE-C μL
E5: K562 Jurkat	3 1.2	5 5	1.6 1.6
K16NLS (peak 2) K562 ¹ Jurkat	1	--	1.6
K16NLSRGD K562 ¹ Jurkat	1	--	1.6
K16NLSRGD + E5 K562	1.8	2.5+2.5	1.6

¹ この表の結果は一連の実験からまとめられた。ペプチドは同実験においては、全く比較されなかった。列挙されたデータは示された懸濁細胞株におけるピーク活性時の DMRIE-C トランスフェクション (DMRIE-C 単独およびペプチド組合せの両方について) の増強倍数である。アッセイは pCMVSPORTβ-gal または、pCMVβ のいずれかを使用して、CAT を用いたアッセイ法を実施した。

表 9: COS-7 細胞におけるペプチドおよびスベルミン結合ペプチドによる
デンドリマー媒介トランスフェクションの増強

トランスフェクション剤	ペプチド剤	RLU
リポフェクタミン	なし	32971
"	K16NLS (ピーク 2)	164105
"	Sp-NLSNLS	200447
"	NLS	224029
G7(EDA)	None	478
"	K16NLS (ピーク 2)	3423
"	Sp-NLSNLS	2832
"	NLS	2749
G9(EDA)	なし	518
"	K16NLS (ピーク 2)	2297
"	Sp-NLSNLS	1702
"	NLS	1747
Arg DMER	なし	29139
"	K16NLS (ピーク 2)	63307
"	Sp-NLSNLS	56548
"	NLS	84209
Lys DMER	なし	2448
"	K16NLS (ピーク 2)	20847
"	Sp-NLSNLS	17203
"	NLS	17689
"COMB BURST"	なし	18453
"	K16NLS (ピーク 2)	28562
"	Sp-NLSNLS	23503
"	NLS	29639

10

20

30

表 10. 一価カチオン性脂質試薬によるトランスフェクションにおける Sp-NLSNLS の効果

脂質	細胞	ピーク活性 (ng b-gal/cm ²)	
		脂質のみ	脂質 + SpNLSNLS
リポフェクチン	CHO-K1	70	805
リポフェクチン	CHO-K1	53	374
リポフェクチン	CHO-K1	20	388
リポフェクチン	CHO-K1	90	688
リポフェクチン	HT29	5	56
リポフェクチン	HT29	36	68
リポフェクチン	HT29	20	31
リポフェクチン	COS7	4.7	167
リポフェクチン	ヒト線維芽細胞	1	97
リポフェクチン	ヒト線維芽細胞	2	197
リポフェクチン	BHK-21	39	497
LipofectACE	CHO-K1	0	53
LipofectACE	HT29	0	4
DMRIE-DOPE	ヒト線維芽細胞	1.4	9.5

表 11. 多価カチオン性脂質試薬によるトランスフェクションにおける Sp-NLSNLS の効果

脂質	細胞	ピーク活性 (ng b-gal/cm ²)	
		脂質単独	脂質 + SpNLSNLS
"CELLFECTIN"	CHO-K1	21	48
"CELLFECTIN"	CHO-K1	190	235
"CELLFECTIN"	NIH3T3	3.5	14
"CELLFECTIN"	ヒト線維芽細胞	0.15	2.3
TMDOS	CHO-K1	1.4	2.9
TMDOS	NIH3T3	0.2	1.3
TMDOS	ヒト線維芽細胞	0.01	0.1
DOSPER	ヒト線維芽細胞	1.4	5.4
"MULTIFECTOR"	ヒト線維芽細胞	0.9	17.6

表 12. デンドリマー「SUPERFECT」によるトランスフェクションにおける Sp-NLSNLS の効果

細胞	ピーク活性 (ng b-gal/cm ²)	
	"SUPERFECT" 単独	SUPERFECT + SpNLSNLS
COS-7	33	84

表：13. 「LIPOFECTAMINE」によるトランスフェクションにおける TAT および
スベルミン TAT ペプチドの効果

サンプル	ng b-Gal / ug タンパク質	ng b-Gal / cm2	ピークの脂質 (ul)	ピークのペプチド (ug)
"LIPOFECTAMINE" 単独	0.93	104.47	1.0	N/A
TAT 単独	0.00	0.1	N/A	2.0
sp-TAT 単独	0.00	0.06	N/A	0.5
TATw/"LIPOFECTAMINE"	3.73	433.05	1.0	1.0
sp-TAT w/"LIPOFECTAMINE"	3.07	312.77	2.0	0.5

表 14. Lipofect AMINE および Lipofectin によるトランスフェクションに対する、
DNA 前複合体中に Sp-NLSNLS とともにレセプター結合タンパク質を含ませることの効果

脂質=リガンド	細胞	ピーク活性 (ng β -gal/cm ²)
"LIPOFECTAMINE:"		
リガンドなし	ヒト線維芽細胞	22.9
インスリン	ヒト線維芽細胞	24.3
トランスフェリン	ヒト線維芽細胞	24.5
インスリン+トランスフェリン	ヒト線維芽細胞	31.3
リガンドなし	CHO-K1	358
インスリン	CHO-K1	452
トランスフェリン	CHO-K1	433
インスリン+トランスフェリン	CHO-K1	460
リガンドなし	ヒト線維芽細胞	16.8
インスリン	ヒト線維芽細胞	34.1
リガンドなし	ヒト線維芽細胞	76.7
インスリン	ヒト線維芽細胞	86.9
"LIPOFECTIN:"		
リガンドなし	ヒト線維芽細胞	17.7
インスリン	ヒト線維芽細胞	22.7
トランスフェリン	ヒト線維芽細胞	30.6
インスリン+トランスフェリン	ヒト線維芽細胞	37.0
リガンドなし	CHO-K1	29
インスリン	CHO-K1	31
トランスフェリン	CHO-K1	44
インスリン+トランスフェリン	CHO-K1	35
DMRIE-DOPE:		
リガンドなし	ヒト線維芽細胞	9.5
インスリン	ヒト線維芽細胞	20.7

表 15. Lipofect AMINE 試薬によるトランスフェクションにおける接着タンパク質・
フラグメントの効果

細胞	ピーク活性 (ng β -gal/cm)	
	LipofectAMINE 単独	LipofectAMINE + レトロネクチン
COS-7	39.5	138.4

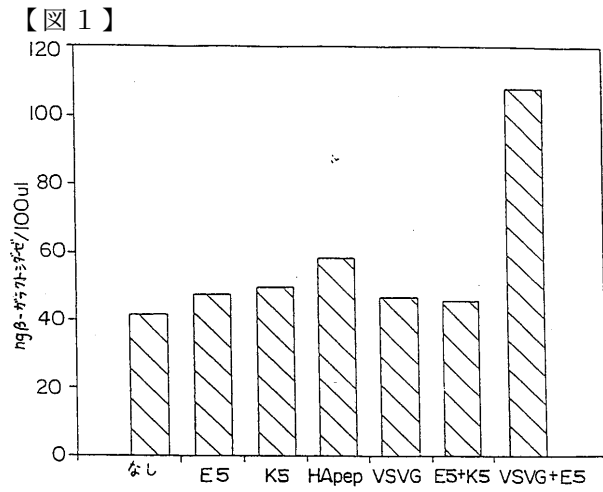


FIG.1

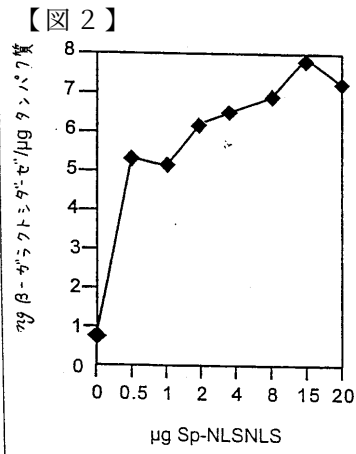


FIG. 2

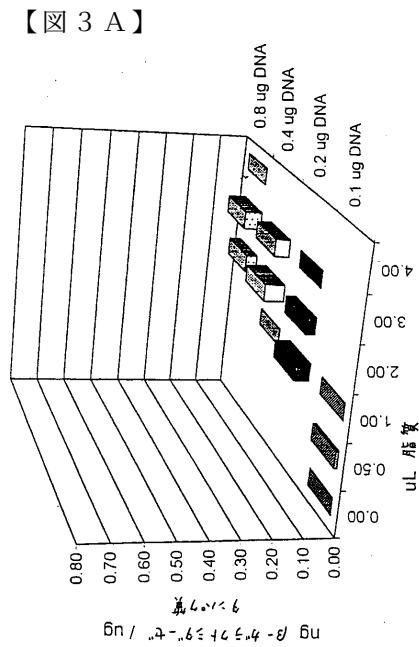


Figure 3A

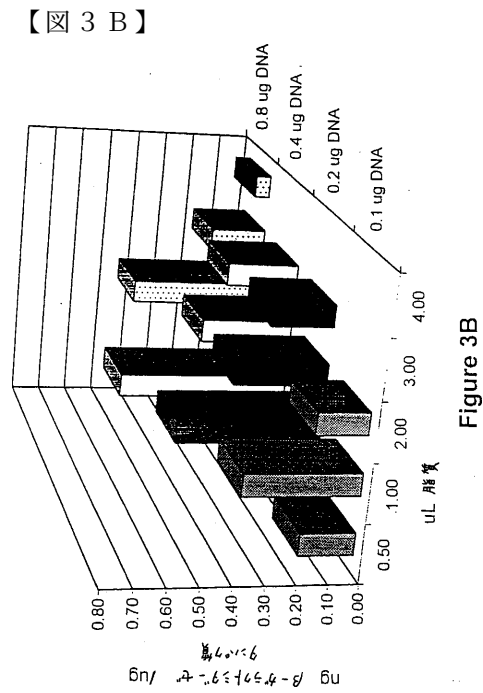


Figure 3B

【図 3 C】

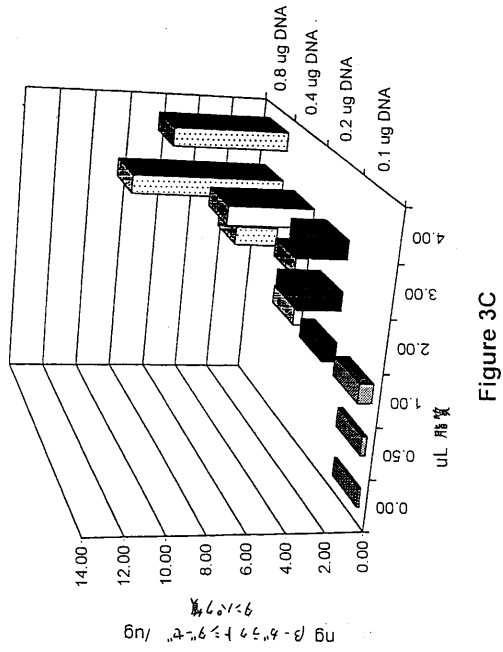


Figure 3C

【図 3 D】

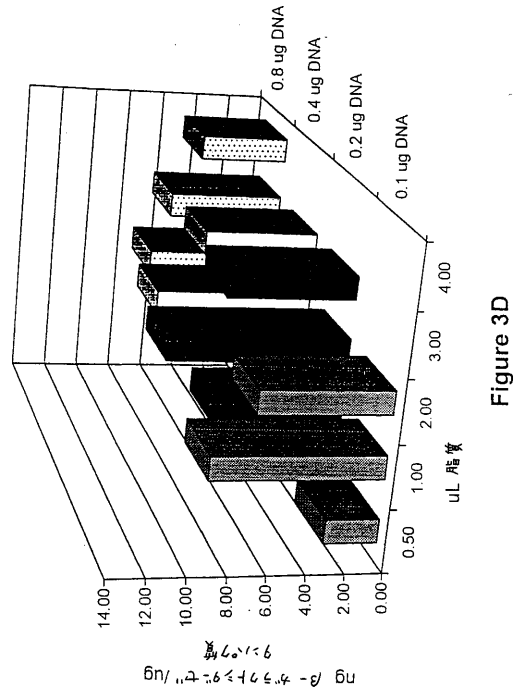


Figure 3D

【図 3 E】

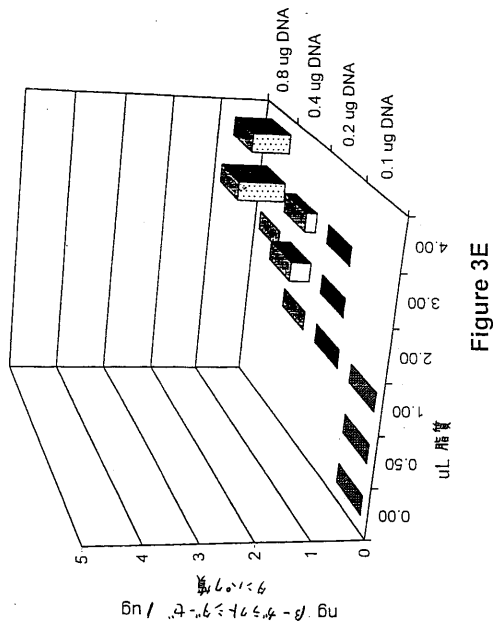


Figure 3E

【図 3 F】

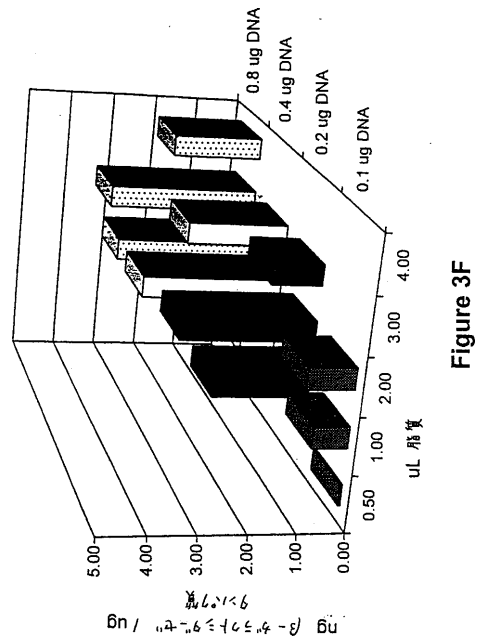


Figure 3F

【図 3 G】

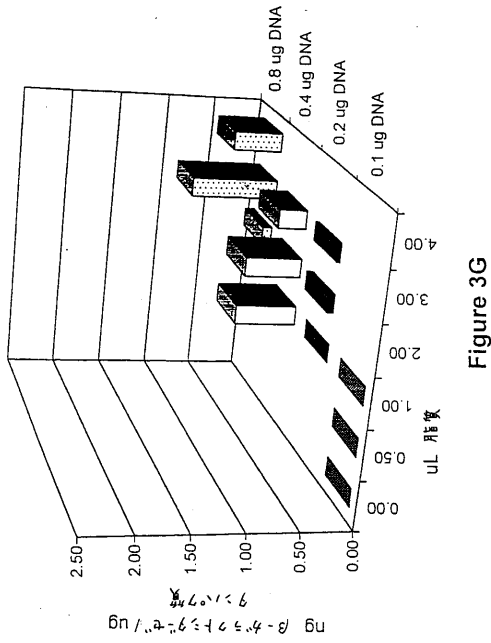


Figure 3G

【図 3 H】

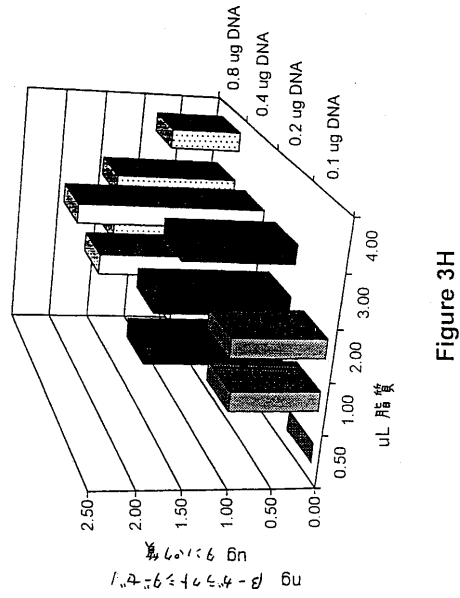


Figure 3H

【図 4 A】

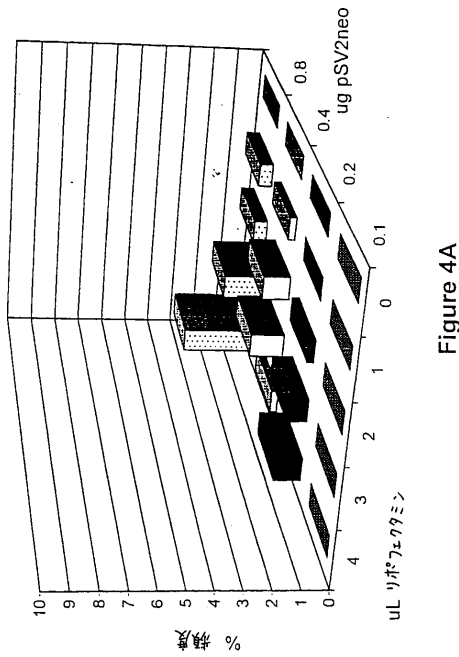


Figure 4A

【図 4 B】

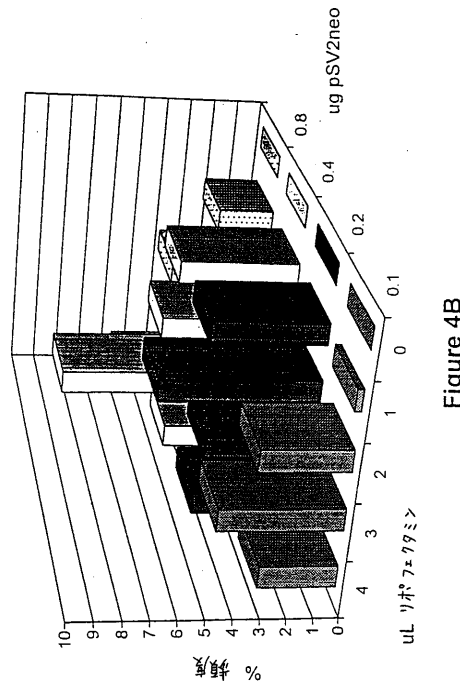


Figure 4B

フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I
C 1 2 N 1/00 (2006.01) C 1 2 N 1/00 U
 C 1 2 P 21/00 (2006.01) C 1 2 P 21/00 C
- (72)発明者 ラン, ジアンクイン
 アメリカ合衆国 メリーランド 2 0 8 7 6, ジャーマンタウン, レッド アドミラル ウェイ
 1 2 1 2 9
- (72)発明者 シー, ポジェン
 アメリカ合衆国 メリーランド 2 1 0 4 4, コロンビア, シャドー レーン 1 0 9 4 2
- (72)発明者 ジェシー, ジョエル エイ.
 アメリカ合衆国 メリーランド 2 0 9 1 0, マウント エアリー, オールド ナショナル パイ
 ク 4 1 3 9
- (72)発明者 チカローネ, バレンティナ シー.
 アメリカ合衆国 メリーランド 2 0 8 7 8, ゲイザーズバーグ, ルトレッジ ドライブ 1 1 0
 4 4
- (72)発明者 エバンス, クリスタ エル.
 アメリカ合衆国 メリーランド 2 0 8 7 4, ジャーマンタウン, チャーチル リッジ サークル
 ナンバー7 1 2 9 0 0
- (72)発明者 シフェルリ, ケビン ピー.
 アメリカ合衆国 メリーランド 2 0 8 7 4, ジャーマンタウン, コテージ ガーデン ドライブ
 ナンバー2 0 4 1 8 0 5 9
- (72)発明者 ゲベエフ, ギリアト
 アメリカ合衆国 メリーランド 2 0 9 1 0, シルバー スプリング, ヘイル プレイス 9 5 1
 2

審査官 ▲高▼ 美葉子

- (56)参考文献 国際公開第9 6 / 0 4 0 9 6 1 (WO, A 1)
 国際公開第9 4 / 0 0 6 9 2 2 (WO, A 1)
 特表平0 7 - 5 0 5 6 3 9 (J P, A)
 特表平0 9 - 5 0 0 1 3 6 (J P, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., D B名)
 C12N 15/09 - 15/90
 A61K 48/00
 JSTPlus(JDreamII)
 JMEDPlus(JDreamII)
 JST7580(JDreamII)
 PubMed
 BIOSIS/WPI(DIALOG)